



**Uniwersytet Warszawski
Wydział Chemii**

**BADANIE MECHANIZMÓW RETENCJI ZWIĄZKÓW
BIOLOGICZNIE AKTYWNYCH
W CHROMATOGRAFII ODDZIAŁYWAŃ
HYDROFILOWYCH**

Aleksandra Maria Sentkowska

Rozprawa doktorska wykonana pod kierunkiem
Prof. dr hab. Krystyny Pyrzyńskiej

Pracownia Analizy Przepływowej i Chromatografii
Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej

Warszawa 2015

Pragnę serdecznie podziękować:

Pani prof. Krystynie Pyrzyńskiej

za nieocenioną pomoc, cierpliwość, mądrość oraz poświęcony czas,

Pani dr hab. Magdalenie Biesadze

za wprowadzenie w tajniki spektrometrii mas, cenne wskazówki i pomoc,

Pani dr hab. Ewie Poboży

za wsparcie w realizacji doktoratu,

Gosi, za wszystko a w szczególności za „spis treści”

Wszystkim koleżankom i kolegom z Pracowni Analizy Przepływowej i Chromatografii

za miłą atmosferę pracy i wsparcie w trakcie realizacji doktoratu,

Mojej Rodzinie, bez której nie byłabym tym, kim jestem. Za wyrozumiałość, cierpliwość

i wsparcie w realizacji życiowych postanowień.

„Krótki jest szlak przez las, gdy u celu czekają ukochani ludzie”

Plemię Mongo

Pracę dedykuję moim Rodzicom oraz Siostrze

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów.....	7
Wstęp i cele pracy	9
1. Chromatografia oddziaływań hydrofilowych	11
1.1. Fazy stacjonarne stosowane w chromatografii HILIC.....	12
1.2. Fazy ruchome stosowane w chromatografii oddziaływań hydrofilowych	16
1.2.1. Wpływ pH fazy ruchomej na efektywność rozdzielania.....	18
1.2.2. Wpływ dodatków do faz ruchomych na efektywność rozdzielania	19
1.3. Główne mechanizmy retencji w HILIC	21
1.3.1. Oddziaływania elektrostatyczne	28
1.1.1. Wiązania wodorowe.....	30
1.2. Wpływ temperatury na efektywność rozdzielania.....	31
1.5. Porównanie HILIC z innymi wariantami chromatografii cieczowej	34
1.6. Zastosowanie chromatografii oddziaływań hydrofilowych.....	36
1.7. HILIC w chromatografii dwuwymiarowej (2D)	40
2. Związki polifenole: budowa i podział.....	44
2.1. Rola związków polifenolowych w tkankach roślinnych i w organizmie człowieka	47
2.2. Występowanie związków polifenolowych w żywności	48
3. Chromatograficzne oznaczanie związków polifenolowych	49
3.1. Wysokosprawną chromatografią cieczową	49
3.2. Ultrasprawną chromatografią cieczową.....	50
3.3. Wysokotemperaturową chromatografią cieczową	52
3.4. Wielowymiarową chromatografią w analizie flawonoidów.....	53
4. Metody detekcji związków polifenolowych	55
4.1. Spektrometria mas w analizie związków polifenolowych	56
5. Aparatura i stosowane odczynniki.....	60
5.1 Warunki prowadzenia analizy chromatograficznej	63
6. Wyniki i ich dyskusja	64
6.1. Optymalizacja pracy spektrometru mas.....	64
6.2. Wyznaczenie logarytmów hydrofobowości analizowanych flawonoidów	66
6.3. Wyznaczenie czasu martwego dla stosowanych kolumn.....	69

6.4. Kolumna Atlantis HILIC	71
6.4.1. Wpływ pH i zawartości rozpuszczalnika organicznego w fazie ruchomej na retencję flawonoidów.....	71
6.4.2. Wpływ stężenia soli na retencję flawonoidów.....	75
6.4.3. Wpływ temperatury na retencję flawonoidów	77
6.4.4. Parametry analityczne i chromatogramy mieszanin wzorcowych.....	78
6.5. Kolumna Luna HILIC.....	83
6.5.1. Wpływ pH i zawartości rozpuszczalnika organicznego w fazie ruchomej na retencję flawonoidów.....	83
6.5.2. Wpływ stężenia soli na retencję flawonoidów.....	86
6.5.3. Wpływ temperatury na retencję flawonoidów	88
6.5.4. Parametry analityczne i chromatogramy mieszanin wzorcowych.....	90
6.6. Kolumna ZIC- pHILIC	94
6.6.1. Wpływ pH i zawartości rozpuszczalnika organicznego w fazie ruchomej na retencję flawonoidów.....	94
6.6.2. Wpływ stężenia soli na retencję flawonoidów.....	98
6.6.3. Wpływ temperatury na retencję flawonoidów	101
6.6.4. Parametry analityczne i chromatogramy mieszanin wzorcowych.....	103
6.7. Kolumna ZIC- HILIC	107
6.7.1. Wpływ podłoża modyfikacji na selektywność rozdzielania i retencję flawonoidów ..	107
6.7.2. Wpływ pH i zawartości rozpuszczalnika organicznego w fazie ruchomej na retencję flawonoidów.....	108
6.7.3. Wpływ stężenia soli na retencję flawonoidów.....	112
6.7.4. Wpływ temperatury na retencję flawonoidów	115
6.7.5. Parametry analityczne i chromatogramy mieszanin wzorcowych.....	118
7. Dyskusja o mechanizmie retencji flawonoidów w chromatografii HILIC	122
7.1. Kolumna Atlantis HILIC i Luna HILIC.....	122
7.2. Kolumny sulfobetainowe ZIC.....	131
8. Zastosowanie chromatografii HILIC w analizie próbek naturalnych	139
9. Podsumowanie	148
Bibliografia.....	151
Załącznik 1 Spis publikacji autorstwa A. Sentkowskiej	166

Załącznik 2	Udział A. Sentkowskiej w konferencjach naukowych	168
Załącznik 3	Stáže zagraniczne odbyte przez A. Sentkowską.....	170

Wykaz stosowanych skrótów

AC- aceton

ACN- acetonitryl

AP- apigenina

C18- kolumna oktadecylowa

C8-kolumna oktanowa

CD-cyklodekstryna

c.d.a.- czysty do analizy (o czystości odczynnika chemicznego)

CHR- chryzyna

CN- kolumna cyjanowa

EGCG- galusan epigallokatechiny

EtOH- etanol

ERLIC- ang. Electrostatic Repulsion Hydrophilic Interaction Chromatography

GEN-genisteina

HED- hesperydyna

HET- hesperetyna

HILIC- chromatografia oddziaływań hydrofilowych

HILIC-ESI/MS- chromatografia oddziaływań hydrofilowych sprzężona ze spektrometrią mas z jonizacją przez elektrorozpylanie

HPLC- wysokosprawna chromatografia cieczowa

IC- chromatografia jonowymienna

IP- izopropanol

KAM- kemferol

KAT- katechina

LUT- luteolina

MeOH- metanol

MOR- moryna

MYR- mirycetyna

NAG- naringenina

NAR- naringina

NP-HPLC- wysokosprawna chromatografia cieczowa w układzie faz normalnych

NP-MS- chromatografia w układzie faz normalnych sprzężona ze spektrometrią mas

Q- kwercetyna

QC- kwercytryna

QSRR- ang. Quantitative Structure-Activity Relationship- ilościowe zależności

struktura-retencja chromatograficzna

RAM- ramnetyna

RUT- rutyna

RP-HPLC- wysokosprawna chromatografia cieczowa w układzie faz odwróconych

TEAA- octan trietyloamoniu

TFA- kwas trifluorooctowy

THF- tetrahydrofuran

Wstęp i cele pracy

Jednym z wyzwań współczesnej chemii analitycznej jest oznaczanie związków występujących w niewielkich stężeniach, często w bardzo skomplikowanej matrycy. Technika, która jest bardzo często stosowana w tego typu analizach, jest chromatografia cieczowa, a w ostatnich dekadach można zaobserwować gwałtowny jej rozwój, zarówno pod względem stosowanych metod detekcji, jak i odmian samej techniki. Rok 1990 niewątpliwie można uznać za jeden z ważniejszych na chromatograficznej osi czasu. Wtedy to A.J. Alpert jako pierwszy zdefiniował pojęcie chromatografii cieczowej oddziaływań hydrofilowych (ang. *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*, HILIC) [1]. Od tamtego czasu obserwuje się duże zainteresowanie analityków właśnie tym wariantem chromatografii. HILIC będąca hybrydą polarnych faz stacjonarnych, stosowanych w chromatografii w układzie faz normalnych (NP-HPLC) i faz ruchomych o dużej zawartości rozpuszczalników organicznych, charakterystycznych dla chromatografii w układzie faz odwróconych (RP-HPLC) jest bardzo trudna do ścisłego zdefiniowania i zamknięcia w ramy równań matematycznych. Pomimo tego, że mechanizm retencji nie jest do końca wyjaśniony, to liczba publikacji dotyczących samych zastosowań, jak i teoretycznego ujęcia tej techniki, ciągle rośnie. Można odnieść wrażenie, że HILIC jest narzędziem, którego brakowało chromatografistom w badaniach związków polarnych, niewykazujących retencji w RP-HPLC a jednocześnie zbyt mocno oddziaływujących z fazami stacjonarnymi w NP-HPLC. To wszystko przyczyniło się do wprowadzenia na rynek różnego rodzaju faz stacjonarnych dedykowanych chromatografii oddziaływań hydrofilowych.

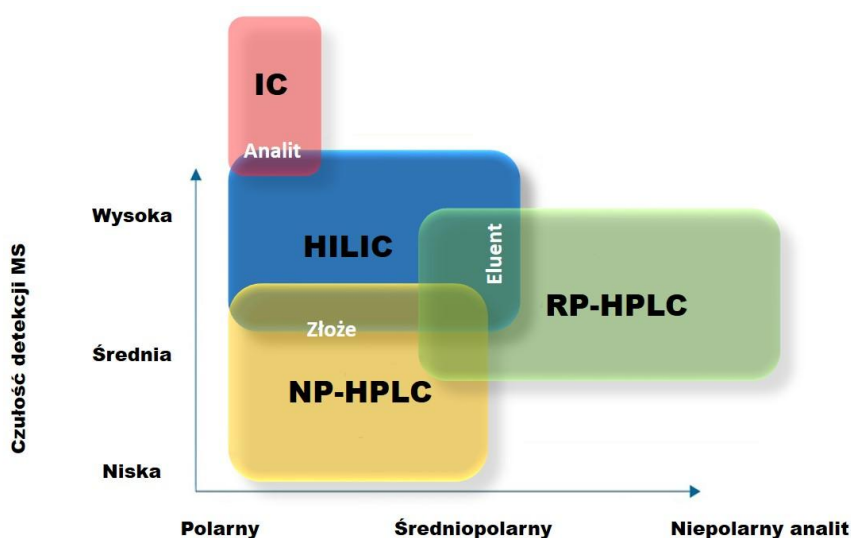
Wspomniane luki w teoretycznym opisie mechanizmu retencji w HILIC, stanowią interesujący obiekt badań i jednocześnie wyzwanie. Początkowo sądzono, że za retencję analizowanych związków odpowiedzialny jest tylko ich podział między hydrofilową warstwę wodną zaadsorbowaną na powierzchni polarnego złoża, a fazę ruchomą o dużej zawartości rozpuszczalnika organicznego. Dziś wiemy już, że wspomniany mechanizm rozdzielania jest o wiele bardziej skomplikowany. Świadczy to o wyjątkowości tej techniki, ale i nie ułatwia dokładnego teoretycznego jej opisu.

Założeniem niniejszej rozprawy doktorskiej było zbadanie mechanizmów retencji związków biologicznie aktywnych na przykładzie grupy flawonoidów w chromatografii cieczowej oddziaływań hydrofilowych. Z drugiej strony chciano sprawdzić potencjał tej techniki w analizie tej grupy związków. W tym celu przeprowadzono optymalizację samych warunków rozdzielania (skład fazy ruchomej, rodzaj użytego rozpuszczalnika organicznego, stężenie soli, pH eluentu) jak i przeprowadzono dokładne badania retencji flawonoidów stosując różnego rodzaju fazy stacjonarne dedykowane dla HILIC. Dokładny opis retencji flawonoidów w tej technice rozdzielania jest zagadnieniem istotnym, ponieważ chromatografia cieczowa oddziaływań hydrofilowych może być interesującą alternatywą w odniesieniu do stosowanej do tej pory w ich analizie chromatografii w układzie faz odwróconych.

Nowatorskim spojrzeniem na scharakteryzowanie mechanizmu retencji w chromatografii oddziaływań hydrofilowych było wykorzystanie do tego celu związków należących do jednej klasy, a tym samym bardzo zbliżonych budową, polarnością i właściwościami. Opublikowane wyniki analogicznych badań prowadzone są z reguły z wykorzystaniem związków znacznie różniących się między sobą tymi parametrami. Przedstawione w niniejszej rozprawie spojrzenie na badanie mechanizmu retencji oraz próba jego scharakteryzowania może dostarczyć cennych informacji, które mogą posłużyć w zdefiniowaniu ogólnego mechanizmu rozdzielania zachodzącego w cieczowej chromatografii oddziaływań hydrofilowych.

1. Chromatografia oddziaływań hydrofilowych

Pomimo, że chromatografię oddziaływań hydrofilowych zdefiniowano dopiero w 1990 roku, to jej zastosowania w praktyce zostały opisane dużo wcześniej. Już w 1975 roku przeprowadzono rozdzielanie cukrów z zastosowaniem polarnej, aminowej fazy stacjonarnej w połączeniu z fazą ruchomą o dużej zawartości acetonitrylu (ACN) [2]. Rozdzielenie cukrów w podobnych warunkach przeprowadził także Palmer [3] na długo przed publikacją Alperta [1]. Pokazuje to pewien trend w chromatografii, polegający na poszukiwaniu alternatywnych technik do tych, już dobrze znanych, a jednocześnie nie do końca radzących sobie z analizą związków polarnych, takich jak wspomniane cukry. To właśnie te poszukiwania dały początek chromatografii oddziaływań hydrofilowych, która nie powinna być w żaden sposób utożsamiana zarówno z chromatografią w układzie faz normalnych jak i odwróconych. Chromatografia HILIC idealnie wpasowuje się w lukę pomiędzy tymi dwoma technikami, czerpiąc pewne elementy z każdej z nich. Stosowane w chromatografii oddziaływań hydrofilowych eluenty są analogiczne jak w chromatografii w układzie faz odwróconych. Z chromatografii w układzie faz normalnych HILIC zaczerpnęła wykorzystanie polarnych faz stacjonarnych. To wszystko stworzyło podwaliny techniki będącej komplementarną do już istniejących. Uzupełnianie się wszystkich wspomnianych typów chromatografii przedstawiono na rysunku 1.

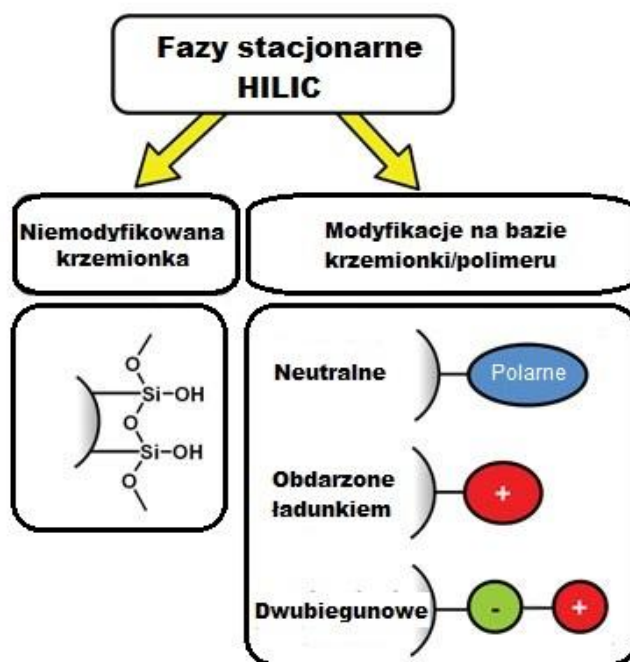


Rys. 1. HILIC na tle innych technik chromatograficznych. Na podstawie [4,5].

Za niewątpliwie dużą zaletę chromatografii HILIC można uznać wysoką czułość detekcji z zastosowaniem spektrometrii mas, ze względu na szczególny skład eluentów o dużej zawartości rozpuszczalników organicznych, których obecność wspomaga jonizację analitów. To wszystko świadczy o atrakcyjności tej techniki na tle pozostałych, a także daje solidne podstawy do konstrukcji układów chromatograficznych w wielu wymiarach (chromatografia 2D).

1.1. Fazy stacjonarne stosowane w chromatografii HILIC

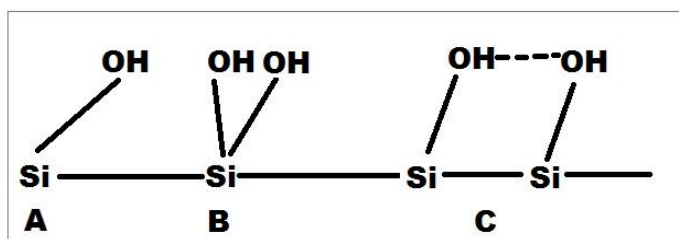
Złoża dedykowane chromatografii oddziaływań hydrofilowych to głównie klasyczny żel krzemionkowy oraz wypełnienia otrzymane przez jego modyfikacje. Schemat podziału faz stacjonarnych dedykowanych chromatografii HILIC przedstawiono na rysunku 2.



Rys. 2. Podział faz stacjonarnych stosowanych w chromatografii HILIC.

Efekt modyfikacji żelu krzemionkowego jest uzyskanie materiału o właściwościach pochodzących zarówno od nieorganicznej krzemionki jak i od organicznego łańcucha. Wariant taki jest najczęściej wykorzystywaną w chromatografii modyfikacją faz stacjonarnych [6-8]. Trzeba jednak pamiętać, że po procesie modyfikacji na powierzchni krzemionki pozostaje pewna ilość grup silanolowych, która może wpływać

na selektywność takiego złoza [9,10]. Grupy silanolowe, które mogą aktywnie uczestniczyć w procesie rozdzielania chromatograficznego przedstawiono na rysunku 3.

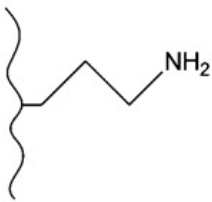
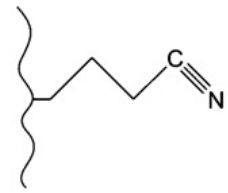
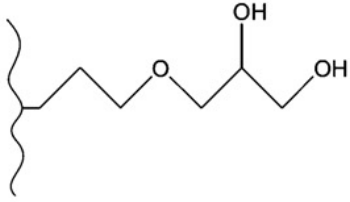


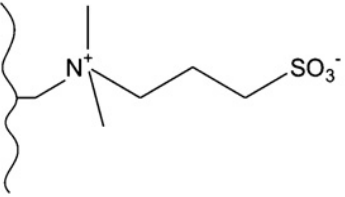
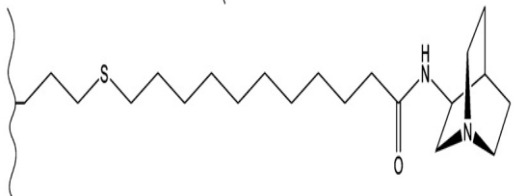
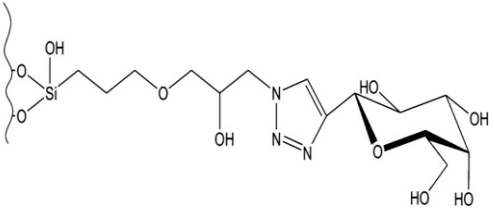
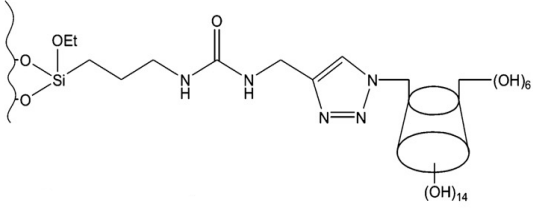
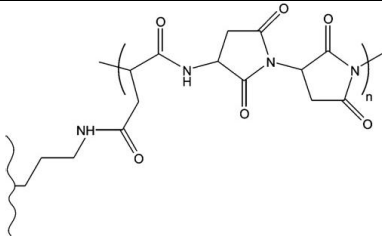
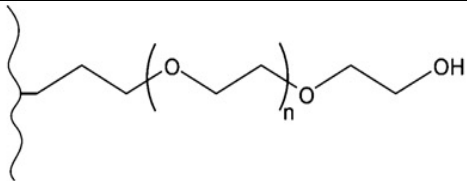
Rys . 3. Rodzaje grup silanolowych na powierzchni krzemionki: A- wole grupy, B- bliźniacze, C- związane [11].

Alternatywną matrycą modyfikacji, wykorzystywaną w procesie produkcji kolumn chromatograficznych jest zastąpienie krzemionki polimerem. Kolumny o podłożu polimerycznym cechują się odpornością w szerokim zakresie pH oraz brakiem dodatkowych oddziaływań pochodzących od matrycy modyfikacji. Najczęściej stosowanymi, polimerycznymi matrycami złoza są pochodne polistyrenu i diwinylobenzenu. Konsekwencją modyfikacji krzemionki bądź polimeru jest powstanie złoza, które można sklasyfikować ze względu na ładunek jaki posiada do trzech grup: złoza neutralnych, obdarzonych ładunkiem oraz dwubiegunowych. Złoza neutralne (np. diolowa faza stacjonarna) cechują się brakiem zdolności do oddziaływań elektrostatycznych z analitem oraz retencją niezależną od pH. Jednak ich słabą stroną jest mniejsza selektywność w odniesieniu do pozostałych dwóch grup. Złoza obdarzone ładunkiem są fazami stacjonarnymi o dużej selektywności. Mają one zdolność to oddziaływań elektrostatycznych z analitem, a obserwowana retencja jest zależna od pH fazy ruchomej. Przykładem takiego złoza jest aminowa faza stacjonarna. Najbardziej selektywną ze wszystkich trzech grup faz stacjonarnych są złoza dwubiegunowe. Cechuje je posiadanie w swojej budowie dwóch grup, najczęściej o przeciwnych ładunkach. Złoże sulfobetainowe, które jest zaliczane do tej grupy, posiada zarówno ujemnie naładowaną grupę sulfonową jak i obdarzoną ładunkiem dodatnim, czwartorzędową grupę amoniową, obie rozdzielone krótkim łańcuchem węglowym. pH fazy ruchomej najczęściej nie wpływa na retencję analitów z zastosowaniem tych złoza. Cechuje je także zdolność do słabych oddziaływań elektrostatycznych.

Na rolę fazy stacjonarnej w procesie rozdzielania w chromatografii HILIC należy patrzeć wielowymiarowo. Jest ona miejscem wytworzenia się hydrofilowej warstwy wodnej, będącej podstawą podziału analitu między tę warstwę, a resztę eluentu. Ponadto analit może oddziaływać bezpośrednio ze złożem na zasadzie adsorpcji. Dodatkowo zdolność fazy stacjonarnej do tworzenia zarówno wiązań wodorowych z analitem, jak i oddziaływań typu dipol-dipol podkreśla wielowymiarowość całego procesu rozdzielania i znacząco wpływa na selektywność danego układu chromatograficznego. W przypadku chromatografii oddziaływań hydrofilowych brak jest jednej, uniwersalnej fazy stacjonarnej, którą można byłoby odnieść do złoża oktadecylowego, stosowanego powszechnie w RP-HPLC. Różnorodność złożów stosowanych w chromatografii HILIC pozwala na bardzo kompleksowe poznanie tej techniki oraz wysnucie pewnych uniwersalnych wniosków dotyczących dominującego mechanizmu rozdzielania w tej technice chromatograficznej. Przykładowe fazy stacjonarne stosowane w chromatografii oddziaływań hydrofilowych razem z przykładami ich zastosowań zebrano w tabeli 1.

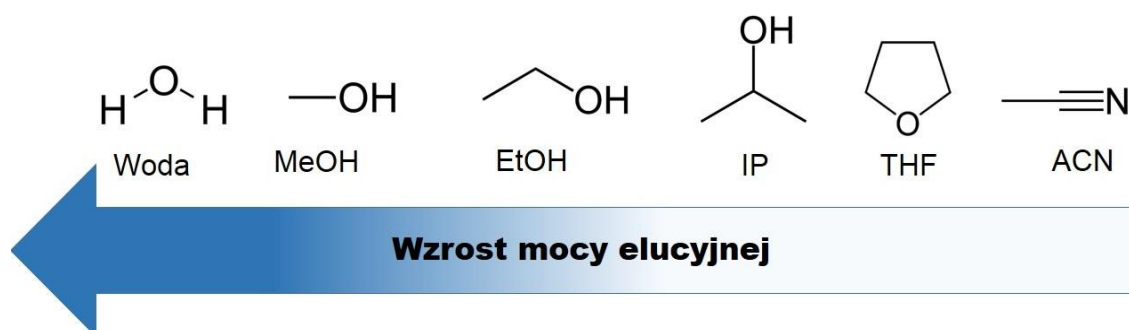
Tabela 1. Przykłady faz stacjonarnych stosowanych w chromatografii HILIC.

Faza stacjonarna	Schemat złoża	Zastosowanie	Literatura
Aminowa		Surfaktanty jonowe i niejonowe	[12,13]
Cyjanowa		Peptydy	[14]
Diolowa		Nikotyna i jej metabolity	[15]

Sulfobetainowa		Flawonoidy	[16]
RP/WAX-AQ		Witaminy rozpuszczalne w wodzie	[17]
Galaktozowa		Aminokwasy	[18]
β - cyklodekstrynowa		Flawony i izofawony	[19]
Polimer kwasu asparaginowego		Histony	[20]
Glikol polietylenowy		Jodki w wodzie morskiej	[21]

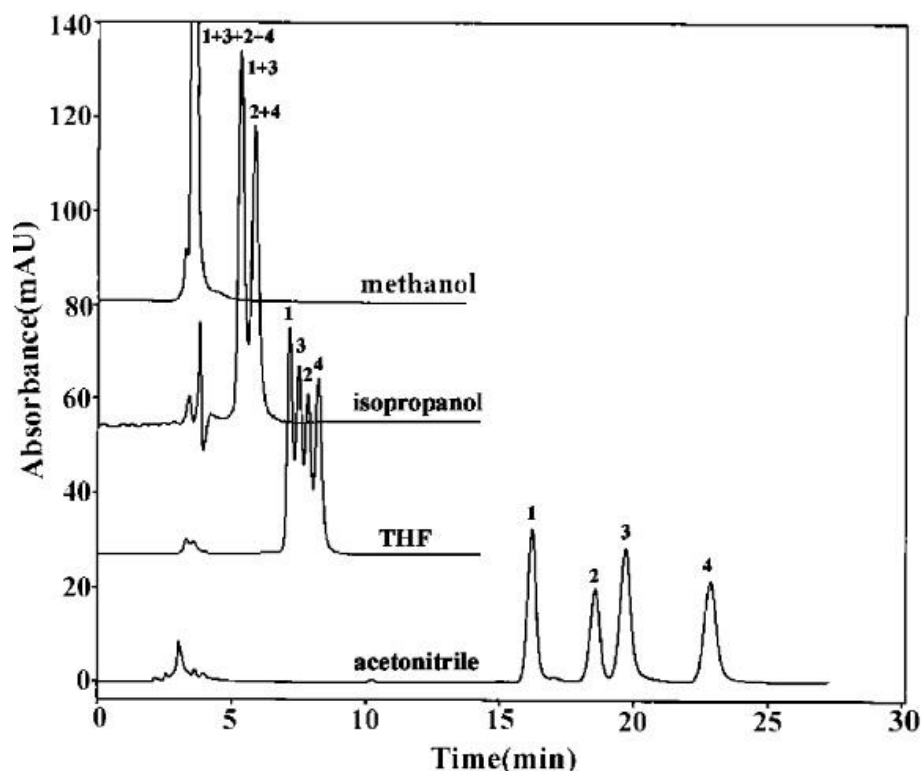
1.2. Fazy ruchome stosowane w chromatografii oddziaływań hydrofilowych

Fazy ruchome stosowane w chromatografii oddziaływań hydrofilowych są mieszaninami rozpuszczalników organicznych, zawierającymi 5-40% wody, soli lub buforu. Dobór odpowiedniego rozpuszczalnika organicznego ma kluczowy wpływ na efektywność rozdzielania. Moc elucyjna w szeregu eluotropowym charakterystycznym dla HILIC rośnie wraz ze wzrostem polarności rozpuszczalnika oraz jego zdolnością do oddziaływań donorowo-akceptorowych. Szereg eluotropowy jest odwrotny niż ten charakterystyczny dla chromatografii w układzie faz odwróconych i został przedstawiony na rysunku 4.



Rys. 4. Szereg eluotropowy w chromatografii HILIC.

Najczęściej stosowanym rozpuszczalnikiem organicznym w fazach ruchomych w HILIC jest acetonitryl. Zapobiega on asymetryczności pików i poprawia ich kształt. Nie mniej jednak spotyka się także użycie metanolu jako komponenta organicznego fazy ruchomej, np. do rozdzielania hydrazyn w półprodukcie farmaceutycznym [22]. Z reguły jednak zastosowanie metanolu i innych alkoholi, powoduje pogorszenie efektywności rozdzielania w porównaniu do acetonitrylu. Bardzo wyraźny wpływ rozpuszczalnika organicznego fazy ruchomej na efektywność rozdzielania zaobserwowano w przypadku rozdzielania epirubicyny i jej trzech analogów z użyciem kolumny silikażelowej Kromasil [23]. Optymalizację rozdzielania pod kątem rodzaju rozpuszczalnika organicznego przedstawiono na rysunku 5.



Rys. 5. Wpływ rodzaju rozpuszczalnika organicznego na efektywność rozdzielania epirubicyny i jej analogów. Faza ruchoma: 20 mM HCOONa/ rozpuszczalnik organiczny (10/90 v/v). 1- epidaunorubicyna, 2- daunorubicyna, 3- epirubicyna, 4- doksorubicyna [23].

W tym przypadku najkrótsze czasy retencji otrzymano stosując metanol oraz izopropanol. Za retencję w obydwu przypadkach są odpowiedzialne w dużej mierze hydrofilowy podział oraz tworzenie wiązań wodorowych [24,25]. Dłuższe czasy retencji w przypadku użycia izopropanolu, tłumaczy się najczęściej bardziej hydrofobowym charakterem tego alkoholu [23]. Za pośrednią wartość czasu retencji otrzymaną w przypadku tetrahydrofuranu odpowiada zdolność tego rozpuszczalnika do tworzenia wiązań donorowo-akceptorowych. Uszeregowanie rozpuszczalników według rosnącej mocy elucyjnej (ACN < THF < IP < MeOH) jest powiązane z ich zdolnością do tworzenia wiązań. Metanol i izopropanol mają zdolność do tworzenia wiązań protonowo-donorowych, natomiast tetrahydrofuran, podobnie jak acetonitryl tworzy wiązania donorowo-akceptorowe. Skrócenie czasów retencji w przypadku użycia metanolu zamiast acetonitrylu, tłumaczy się zbyt małą różnicą w polarności oraz w budowie w stosunku do wody, co utrudnia tworzenie się hydrofilowej warstwy wodnej na powierzchni fazy

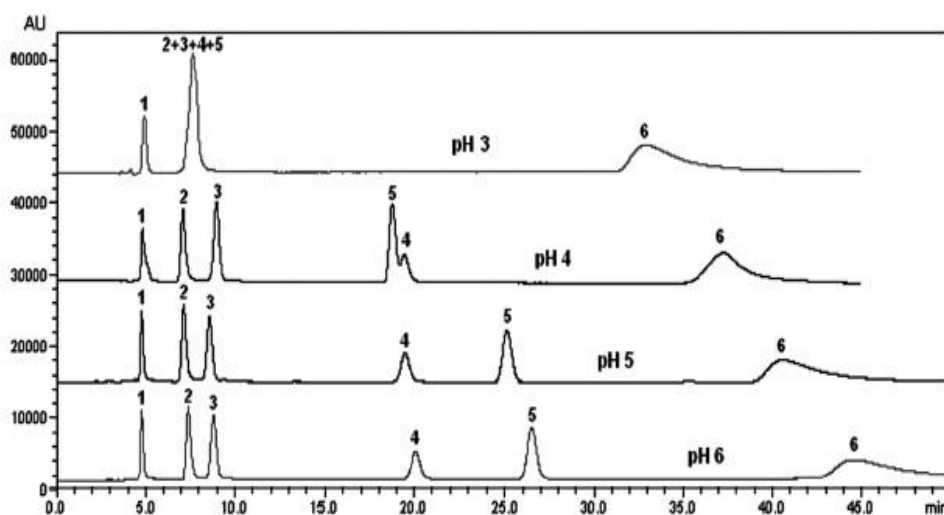
stacjonarnej. Poza tym nie jest ona już tak atrakcyjna pod kątem polarności dla analitów, co znacznie skraca ich retencję. Zastąpienie acetonitrylu acetonem, który cechuje się zbliżoną polarnością, skutkuje pogorszeniem efektywności oraz czułości detekcji zarówno z wykorzystaniem detekcji UV-Vis (absorbując światło), ale także z zastosowaniem spektrometrii mas, co dyskwalifikuje go w szerszych zastosowaniach [26].

1.2.1. Wpływ pH fazy ruchomej na efektywność rozdzielania

Zakres pH faz ruchomych, które mogą być stosowane w chromatografii jest ściśle określony przez matrycę złoża danej kolumny. Dla kolumn silikażelowych zakres ten mieści się w przedziale 2-8 jednostek pH, dla kolumn o podłożu polimerycznym rozszerza się on do pH 10 lub więcej. Parametr ten ma kluczowe znaczenie dla efektywności rozdzielania. Poprzez pH eluentu wpływa się nie tylko na formę samego analitu, ale także na jonizację faz stacjonarnych. W tym przypadku należy rozważyć zarówno jonizację grup, którymi jest zmodyfikowana krzemionka, jak i grup silanolowych, będących integralną jej częścią. Grupy silanolowe są zdysocjowane w wysokim pH i są wtedy obdarzone ładunkiem ujemnym. W takiej sytuacji dodatkowo naładowane anality będą wykazywać większą retencję. Jednakże anality o charakterze słabych kwasów w tych warunkach pH będą ujemnie naładowane, co znacznie skróci ich retencję ze względu na oddziaływania odpychające między nimi a ujemnie naładowanymi grupami silanolowymi.

W przypadku chromatografii HILIC wpływ pH na efektywność rozdzielania nie jest prosty do przewidywania. Należy pamiętać, że w rozważaniach tych posługujemy się wartością pH wodnego komponenta fazy ruchomej. Natomiast cechą charakterystyczną chromatografii HILIC są eluenty o dużej zawartości rozpuszczalników organicznych. Przyjmuje się zatem, że wartość pH wodnego składnika fazy ruchomej jest znacząco różna od pH całości eluentu. W kwasowych eluentach obserwuje się wyższe pH fazy ruchomej od pH komponenta wodnego, użytego do jej przygotowania [27,28]. Wpływ pH fazy ruchomej na efektywność rozdzielania przedstawiono na rysunku 6. Optymalnym pH fazy ruchomej stosowanej do rozdzielania pięciu rozpuszczalnych w wodzie witamin jest pH 5 [29]. W pH 3 następuje koelucja pirydoksyny, ryboflawiny, kwasu nikotynowego oraz kwasu askorbinowego. Zastosowanie eluentu o pH wyższym o jednostkę znacznie

poprawia efektywność rozdzielania, jednak dla kwasu nikotynowego i askorbinowego wciąż obserwowana jest niska rozdzielczość. Dopiero zwiększenie pH do 6 skutkuje zadowalającą efektywnością rozdzielania. Dalszy wzrost pH fazy ruchomej nie wpływa już znacząco na rozdzielanie.

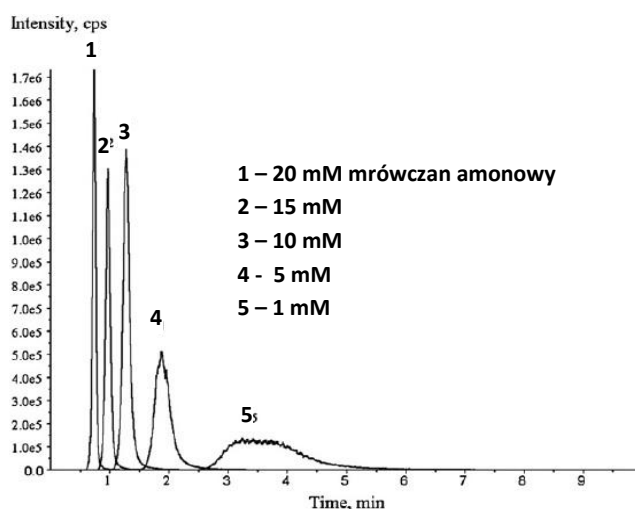


Rys 6. Wpływ pH fazy ruchomej na rozdzielanie rozpuszczalnych w wodzie witamin. Kolumna: Intersil diol (150 x 4,6 mm), eluent: 90:10 ACN/ 10 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$. 1-nikotynoamid, 2-pirydoksyna, 3-ryboflawina, 4-kwas nikotynowy, 5-kwas askorbinowy, 6-tiamina [29].

1.2.2. Wpływ dodatków do faz ruchomych na efektywność rozdzielania

W celu poprawienia zarówno kształtów sygnałów jak i efektywności całego rozdzielania często stosuje się dodatki do fazy ruchomej. Producenci komercyjnych kolumn prawie zawsze polecają użycie octanu amonu zamiast wody w eluencie. Ma to na celu ograniczenie oddziaływania polarnych analitów z grupami silanolowymi pochodzącymi z krzemionkowej matrycy. Jednakże dodatek buforu do fazy ruchomej może mieć różnorodne skutki. W przypadku polarnych, nieposiadających ładunku faz stacjonarnych, dodatek buforu powoduje znaczący wzrost retencji analitów. Fakt ten tłumaczy się ułatwieniem tworzenia wiązań wodorowych między analitem a fazą stacjonarną. Jednakże wzrost siły jonowej eluentu może powodować także spadek retencji analitów [30].

Kolumny dedykowane chromatografii HILIC łatwiej ulegają przeładowaniu niż te stosowane w RP-HPLC [31]. Fakt ten powoduje, że sygnały rejestrowane z zastosowaniem chromatografii HILIC są asymetryczne. Aby temu zapobiec często stosuje się właśnie dodatek buforu do fazy ruchomej. Znaczną poprawę kształtu sygnału oraz skracanie czasu retencji wraz ze wzrostem stężenia mrówczanu amonu w fazie ruchomej zaobserwowano podczas analizy inhibitora dipeptydylopeptydazy IV (DPP-IV) we krwi małpy [32].



Rys. 7. Wpływ stężenia mrówczanu amonu na kształt sygnału inhibitora dipeptydylopeptydazy IV [32].

Wraz ze wzrostem stężenia buforu zaobserwowano spadek wartości współczynnika ogonowania sygnału z 1,95 (dla 1 mM HCOONH_4) do 0,939 dla maksymalnego jego stężenia. Znacznemu skróceniu uległ także czas retencji sygnału. Rozdzielenie prowadzono z zastosowaniem silikażelowej kolumny Atlantis HILIC, dlatego też krótszy czas retencji można tłumaczyć rywalizacją jonów pochodzących z buforu a analitem o miejsce do oddziaływania na fazie stacjonarnej. Sugeruje to znaczny udział oddziaływań elektrostatycznych w ogólnym mechanizmie rozdzielania.

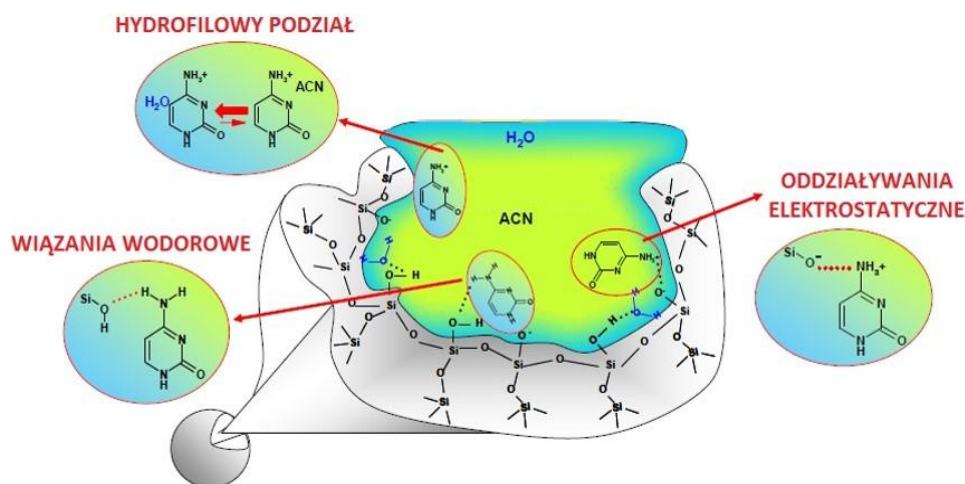
W celu poprawienia kształtu sygnału często stosowany jest dodatek kwasu trifluorooctowego (TFA). Jego działanie jest szczególnie widoczne dla kolumn o podłożu silikażelowym. Nieznaczny dodatek TFA (0,05%) znacząco ograniczył ogonowanie pików podczas analizy aglikonów flawonoidów występujących w próbkach żywności [33]. Huck i współ. [34] podkreślają działanie TFA w zapobieganiu dysocjacji grup fenolowych

podobnych związków. Oprócz TFA także kwas octowy i mrówkowy był dodawany do fazy ruchomej, jednak ich wpływ na poprawę kształtu sygnału nie był już tak znaczący jak w przypadku TFA [35]. Ponadto dodatek buforu wspomaga jonizację w źródle jonów spektrometru mas, a więc znacząco wpływa na czułość oznaczeń. Znaczną poprawę efektywności rozdzielania kwasów nukleinowych, kofeiny, kortyzolu oraz flurbiprofenu uzyskano po dodatku do eluentu (etanol/woda) dwutlenku węgla, porównywalną do tej z zastosowaniem eluentu ACN/woda [36].

Kompozycja składu faz ruchomych stosowanych w chromatografii HILIC pozwala na dobranie optymalnych warunków analizy pod kątem charakterystyki badanych związków. Różnorodność wariantów kompozycji samych eluentów, jak i dodatków do nich spotykanych w literaturze, jedynie podkreśla nietuzinkowość tej techniki i możliwość jej zastosowania w szerokim spektrum analiz.

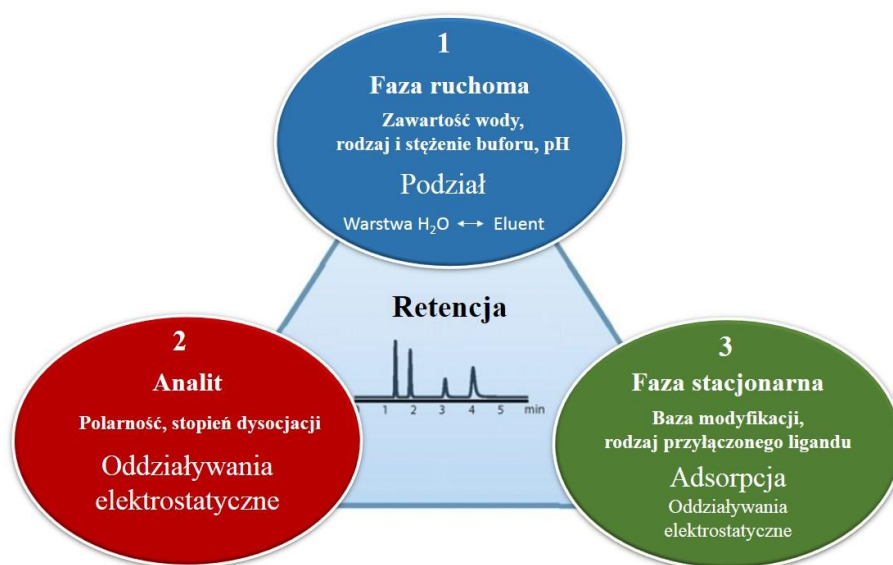
1.3. Główne mechanizmy retencji w HILIC

Chromatografia oddziaływań hydrofilowych doskonale nadaje się do wykorzystania w analizie związków polarnych, zarówno obdarzonych ładunkiem jak i obojętnych. Jednak teoretyczny opis mechanizmu rozdzielania mającego miejsce w chromatografii oddziaływań hydrofilowych nastrocza wielu problemów i wciąż jest pełen niejasności. Alpert postulował hydrofilowy podział analitu między wodną warstwę wytworzoną na powierzchni fazy stacjonarnej a niepolarny eluent [1]. W rzeczywistości mechanizm retencji charakterystyczny dla chromatografii oddziaływań hydrofilowych jest o wiele bardziej skomplikowany [37-39]. Badania dowiodły, że oprócz hydrofilowego podziału, na retencję analitów w chromatografii HILIC ma wpływ także ich adsorpcja bezpośrednio na fazie stacjonarnej, tworzenie wiązań wodorowych oraz oddziaływania elektrostatyczne. Niektóre z wymienionych oddziaływań zilustrowano na rysunku 8 na przykładzie niemodyfikowanej krzemionki.



Rys. 8. Niektóre z możliwych oddziaływań mających wpływ na mechanizm retencji w chromatografii oddziaływań hydrofilowych.

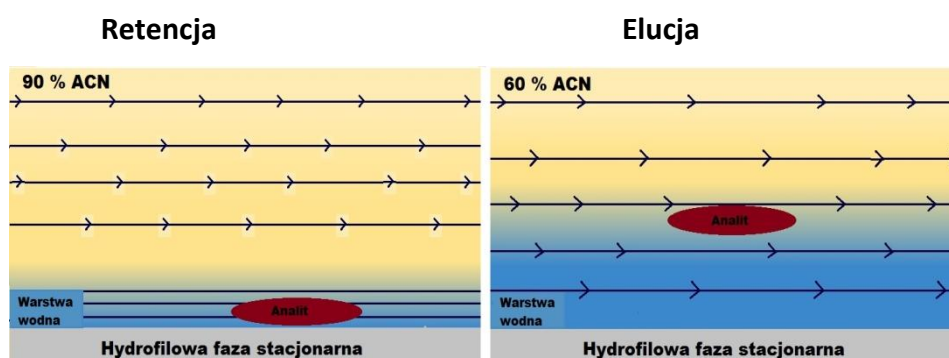
Poszczególne oddziaływania składające się na ogólny mechanizm rozdzielania są ściśle zależne od rodzaju zastosowanej fazy stacjonarnej oraz fazy ruchomej, jej wartości pH, rodzaju użytego komponenta organicznego i nieorganicznego, a także od formy chemicznej w jakiej występuje sam analit (rys. 9).



Rys. 9. Poszczególne składowe mechanizmu retencji w chromatografii HILIC [40].

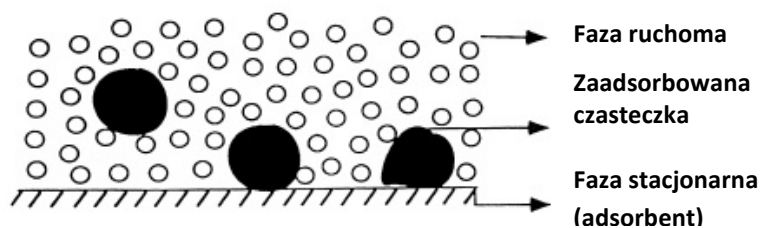
Jeden z pierwszych proponowanych mechanizmów retencji w HILIC zakłada podział analitu między hydrofilową warstwę wodną zaadsorbowaną bezpośrednio na powierzchni

fazy stacjonarnej, a niepolarny eluent [1]. W toku badań nad chromatografią HILIC eksperymentalnie udowodniono, że warstwa wodna tworzy się i jest ona w dużej mierze odpowiedzialna za retencję analitów [41]. Jest to zjawisko charakterystyczne dla tego typu chromatografii, a minimalna zawartość wody w eluencie konieczna do jej powstania to 2-3% [42]. Zatem za retencję analitów w dużej mierze odpowiedzialna jest ich polarność. Anality o wysokiej polarności będą chętniej przechodzić do warstwy wodnej, a tym samym wykazywać znaczną retencję (niepolarny eluent nie jest dla nich atrakcyjny). I odwrotnie, niepolarne związki niechętnie będą przechodzić do warstwy wodnej. Można tu mówić o rozdzielaniu w układzie ciecz-ciecz. Zwiększenie procentowej zawartości wody w eluencie powoduje znaczne powiększenie się warstwy wodnej, ale i zmniejszenie różnicy w polarności układu warstwa wodna-eluent. Prowadzenie rozdzielania w takich warunkach skutkuje znacznym skróceniem czasów retencji nawet bardzo polarnych analitów. Możemy zatem mówić o elucji analitu z zastosowaniem fazy ruchomej o dużej zawartości wody. Zarówno retencję jak i elucję zilustrowano na rysunku 10.



Rys. 10. Retencja i elucja analitu w zależności od zawartości wody w fazie ruchomej [43].

Model adsorpcyjny jest ogólnie przyjęty, jako decydujący mechanizm rozdzielania w chromatografii w układzie faz normalnych [31]. Adsorpcja jest definiowana, jako oddziaływanie cieczy bądź gazu z ciałem stałym [44]. Na początku rozdzielania chromatograficznego powierzchnia fazy stacjonarnej jest wysycona jedynie cząsteczkami eluentu. Jeśli analit ma być zatrzymany przez złożę, odpowiednia ilość cząsteczek fazy ruchomej musi opuścić powierzchnię złoża (rys. 11).



Rys. 11. Schemat adsorpcji analitu na fazie stacjonarnej [42].

W ujęciu matematycznym mechanizm podziałowy definiowany jest, podobnie jak w układzie faz odwróconych, równaniem [38]:

$$\log k = \log k_0 - S \varphi \quad (1)$$

gdzie: k to współczynnik retencji danego związku, k_0 - ekstrapolowany współczynnik retencji analitu, gdyby fazą ruchomą była czysta woda, S - wartość stała, charakterystyczna dla badanego analitu w danym układzie HILIC, φ - ułamek objętościowy rozpuszczalnika organicznego w fazie ruchomej.

Do opisu mechanizmu retencji opartego na adsorpcji stosuje się równanie Soczewińskiego- Snydera [40]:

$$\log k = \log k_0 - m \log \varphi \quad (2)$$

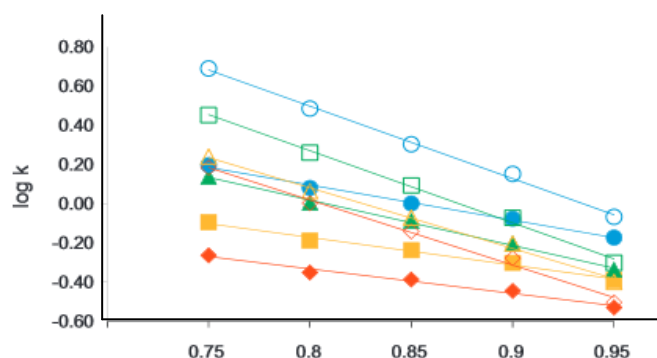
gdzie: k_0 to ekstrapolowany współczynnik retencji analitu, gdyby fazą ruchomą była czysta woda, m - współczynnik określający ilość molekuł fazy ruchomej, które zostały zastąpione cząsteczkami analitu, φ - ułamek objętościowy rozpuszczalnika organicznego w fazie ruchomej.

Należy jednak zauważyć, że równanie (2) nie obejmuje układów, w których zawartość wody w eluencie jest mniejsza niż 2% [45]. Odnosząc to spostrzeżenie do układów HILIC, adsorpcja spowodowana jest raczej oddziaływaniami elektrostatycznymi (przyciągającymi lub odpychającymi), tworzeniem wiązań wodorowych i innymi oddziaływaniami między analitem a fazą stacjonarną.

Na podstawie uzyskanej liniowej zależności $\log k$ od ułamka objętościowego rozpuszczalnika organicznego (φ) lub $\log k$ vs. $\log \varphi$, autorzy wielu prac wysuwają wnioski odnośnie mechanizmu retencji badanych analitów. W niektórych przypadkach uzyskane

wyniki są lepiej opisywane modelem podziałowym [46,47-49], w innych wskazują na lepszą adekwatność zastosowania modelu adsorpcyjnego [46,50-52].

Przykładem dominującego mechanizmu podziału jest rozdzielanie nukleotydów i nukleozydów na kolumnie XBridge Amide (rys. 12) [48].



Rys. 12. Zależność współczynnika od składu fazy ruchomej dla nukleotydów i nukleozydów. Kolumna XBridge Amide (4.6x 150 mm); eluent: 90:10 methanol/75mM fosforan amonowy. ♦ adenozyna, ■ uracyl, ▲ cytydyna, ● guanozyna, ▲ fosforan disodowy cytydyny, ■ fosforan disodowy uracylu, ○ fosforan disodowy guanozyny [48].

Przykładem rozdzielania, za które odpowiada adsorpcja analitów na złożu jest analiza melaminy i produktów jej hydrolizy [50]. Stosowano kilka różnych faz stacjonarnych i dla każdej z nich na podstawie uzyskanych wyników wykreślono zależności współczynnika retencji od procentowej zawartości wody w eluencie lub od jej logarytmu (tabela 2).

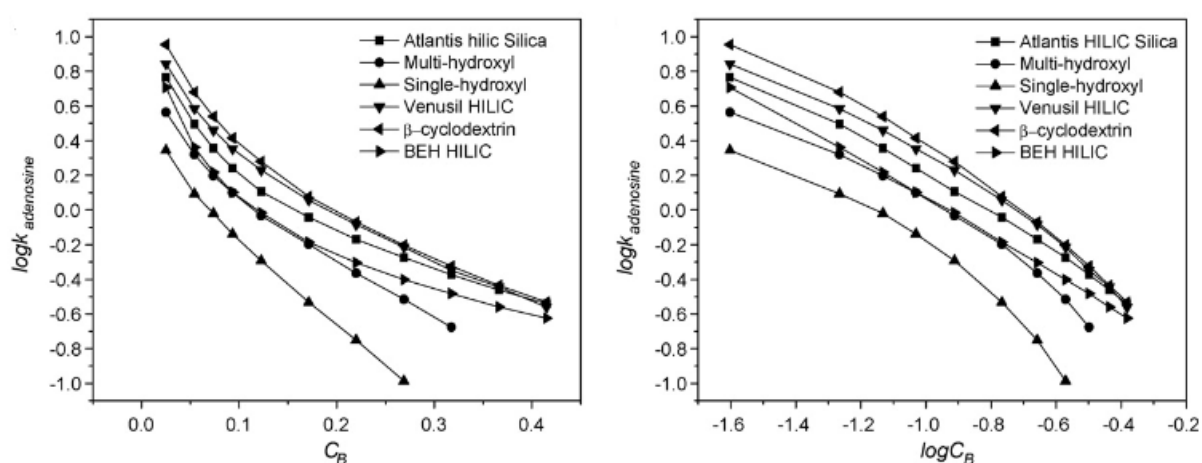
Tabela 2. Współczynniki korelacji liniowej dla zależności potwierdzających wybrany mechanizm retencji melaminy i produktów jej hydrolizy [50].

Analit	R ²	
	Model podziału	Model adsorpcji
<i>TSKgel Amide-80</i>		
Kwas cyjanurowy	0,9932	0,9989
Ammelid	0,9920	0,9994
Ammelina	0,9878	1,0000
Melamina	0,9868	1,0000
<i>XBridge HILIC</i>		
Kwas cyjanurowy	0,7500	0.8622

Ammelid	0,9758	0,9998
Ammelina	0,9774	0,9999
Melamina	0,9745	0,9997
<i>ZIC-HILIC</i>		
Kwas cyjanurowy	0,9872	0,9985
Ammelid	0,9877	0,9987
Ammelina	0,9691	0,9897
Melamina	0,9231	0,9582
<i>Hypersil APS-2</i>		
Kwas cyjanurowy	0,9561	0,9697
Ammelid	0,9329	0,9964
Ammelina	0,9226	0,9936
Melamina	0,9462	0,9980

Zarówno dla modelu podziałowego, jak i adsorpcyjnego, otrzymane współczynniki korelacji liniowej były wysokie. Jednakże dla każdego analitu to wartość współczynnika sugerująca dominującą adsorpcję jest większa. Różnica ta jest największa w przypadku kwasu cyjanurowego. Autorzy skłonili się do opinii, że decydującym mechanizmem rozdzielania melaminy i produktów jej hydrolizy jest adsorpcja bezpośrednio na powierzchni fazy stacjonarnej, gdyż współczynniki dopasowania dla tego modelu są bliskie 1.

Jednak w przypadku niektórych układów, żaden z przedstawionych modeli nie opisuje dobrze mechanizmu rozdzielania w HILIC [53-56]. Przykładem mogą być zależności uzyskane dla adenozyiny przedstawione na rysunku 13 [56]; dla obu rozpatrywanych modeli retencji nie uzyskano prostoliniowych zależności.



Rys. 13. Zależność liniowa i logarytmiczna udziału frakcji wodnej w fazie ruchomej od współczynnika retencji dla adenozyiny dla różnych kolumn [56].

W literaturze cytowane są jeszcze inne modele retencji, powstałe w wyniku zsumowania modeli opisujących retencję w funkcji zawartości rozpuszczalnika organicznego odpowiednio dla chromatografii w normalnym i odwróconym układzie faz, przy założeniu addytywności adsorpcyjnego i podziałowego mechanizmu w HILIC:

- model zaproponowany przez Lianga i wsp. [56] wyrażony zależnością:

$$\ln k = a + b\varphi_{H_2O} + c \ln \varphi_{H_2O} \quad (3)$$

gdzie: a – parametr związany z objętością molekularną, b – odnosi się do energii oddziaływań pomiędzy analitem i eluentem, c - parametr odpowiedzialny za oddziaływanie analit-faza stacjonarna.

- model zaproponowany przez Janderę i Hajeka [57] wprowadzający dodatkowy parametr uwzględniający małą zawartość wody w eluencie i wyrażony zależnością:

$$\ln k = a + b \varphi_{H_2O} - c \ln (1 + p\varphi_{H_2O}) \quad (4)$$

Wartości poszczególnych parametrów występujących w proponowanych modelach wyznaczano metodą regresji liniowej przez minimalizację sum kwadratów różnic między danymi doświadczalnymi i teoretycznymi. Modele matematyczne mogą znaleźć zastosowanie praktyczne w procedurach związanych z doбором i optymalizacją składu fazy ruchomej w chromatografii oddziaływań hydrofilowych.

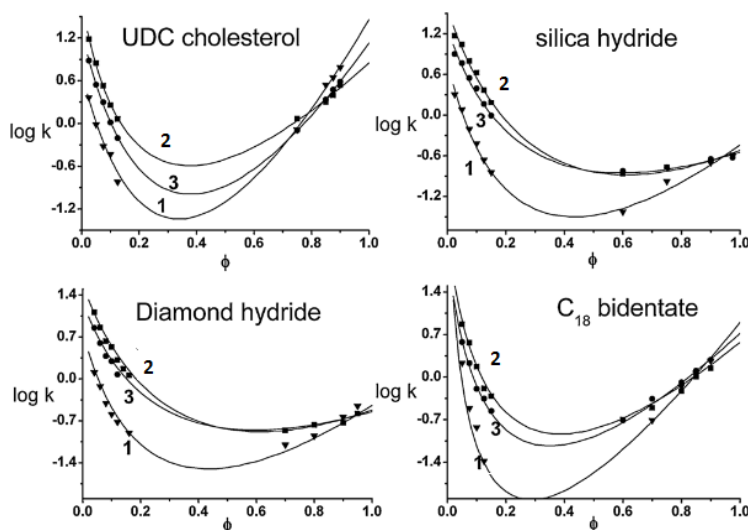
W zależności od zawartości rozpuszczalnika organicznego w eluencie, wpływ na ogólny mechanizm retencji w HILIC ma kombinacja mechanizmów charakterystycznych dla chromatografii w odwróconym (eluenty bogate w wodę) i normalnym układzie faz (eluenty bogate w rozpuszczalnik organiczny). Względny udział poszczególnych mechanizmów i oddziaływań zależy także od rodzaju i właściwości fazy stacjonarnej i ruchomej oraz efektów związanych ze strukturą i właściwościami rozdzielanych związków. Ten podwójny mechanizm retencji w HILIC jest obserwowany w wielu przypadkach na wykresach zależności $\log k$ vs. φ_{H_2O} w kształcie litery "U" [57-60] i opisywany zależnością:

$$\log k = a + m_{RP} \varphi_{H_2O} - m_{HILIC} \log \varphi_{H_2O} \quad (5)$$

gdzie: m_{RP} – charakteryzuje efekt związany ze wzrostem zawartości wody w eluencie (wzrost udziału mechanizmu obserwowanego dla układu faz odwróconych), m_{HILIC} –

charakteryzuje udział oddziaływań hydrofilowych w retencji przy dużej zawartości rozpuszczalnika organicznego w eluencie.

Graficzna ilustracja równania (5) jest przedstawiona jest na rysunku 14 na przykładzie czterech różnych kolumn. Otrzymane zależności dla kwasów fenolowych wykazują minima, przy których następuje zmiana mechanizmu retencji analitów z HILIC na RP.

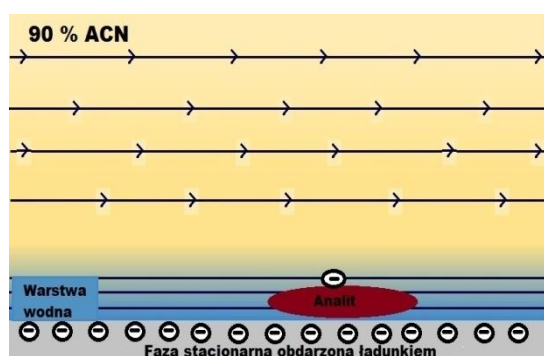


Rys. 14. Wpływ objętości frakcji wodnej (10 mM CH₃COONH₄) na współczynniki retencji kwasów fenolowych na różnych kolumnach. 1 – kwas salicylowy; 2 – kwas 4-hydroksyfenylooctowy, 3 – kwas *p*-hydroksybenzoesowy [60].

1.3.1. Oddziaływania elektrostatyczne

Z założeń chromatografii oddziaływań hydrofilowych wynika, że anality obdarzone ładunkiem mogą być z powodzeniem rozdzielane z zastosowaniem tej techniki, gdyż są one bardziej polarne od ich niezdisocjowanych form [37]. Zatem na efektywność ich rozdzielania wpływ będzie mieć nie tylko wspomniane wcześniej zjawisko podziału i adsorpcji, ale także możliwe oddziaływania elektrostatyczne z grupami będącymi modyfikacjami fazy stacjonarnej lub z grupami silanolowymi, pochodzącymi od matrycy złoża. Oddziaływania te mogą być albo odpychające, albo przyciągające, w zależności od ładunku analitu i grupy, z którą oddziałuje [61]. Początkowo sądzono, że

mechanizm ten jest analogiczny do obserwowanego w chromatografii jonowymiennej. Jednak badania dowiodły, że w przypadku chromatografii HILIC jest on jeszcze bardziej złożony [62,63]. Jest to związane z faktem, że analit obdarzony ładunkiem o takim samym znaku, co grupa pochodząca z fazy stacjonarnej nadal ulega retencji na złożu ze względu na mechanizm podziałowy; jest on zatrzymywany przez polarną warstwę wodną ze względu na swoją polarność pomimo tego, że obserwowane jest jego jednoczesne odpychanie z ładunkami o tym samym znaku, pochodzącymi ze złoża. Mechanizm taki został zdefiniowany przez Alperta jako ERLIC (ang. *Electrostatic Repulsion Hydrophilic Interaction Chromatography*) [64]. Schematycznie zilustrowano go na rysunku 15.



Rys. 15. Schemat retencji ujemnie naładowanego analitu z zastosowaniem ujemnie naładowanego złoża [43].

Jako, że w chromatografii HILIC do analizy obdarzonych ładunkiem, polarnych analitów, wykorzystuje się polarne fazy stacjonarne zawierające zjonizowane indywidua, to należy rozważyć także możliwość mechanizmu jonowymiennego jako jednego ze składowych do ogólnego mechanizmu retencji w HILIC. Możliwy jest zarówno kationo- jak i anionowymienny jego wariant. W mechanizmie kationowymiennym, dodatnio naładowany analit oddziałuje z ujemnie naładowanymi grupami ze złoża. Przypadek taki został opisany dla kolumny krzemionkowej, gdzie grupy silanolowe były zdysocjowane w badanym zakresie pH [65]. Drugim z możliwych mechanizmów jest mechanizm anionowymienny. Ma on miejsce, gdy zdysocjowany analit oddziałuje z dodatnio naładowanymi grupami z fazy stacjonarnej, np. grupami aminowymi. Obydwa te mechanizmy mogą w znaczący sposób wpływać na współczynniki retencji rozdzielanych analitów. Podobnie jak w chromatografii jonowymiennej wielkość tego wpływu określa stężenie przeciwjonu w eluencie, który ma wypierać analit ze złoża i być w dużej mierze

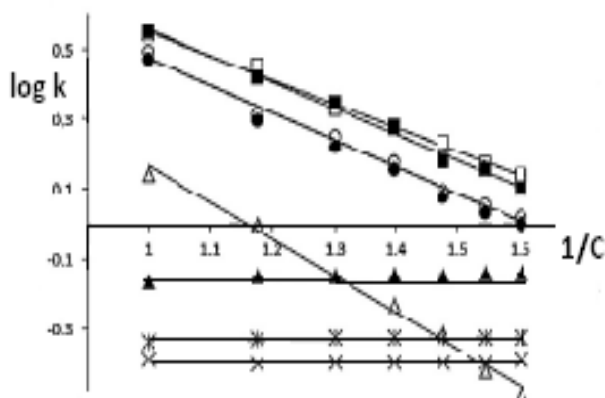
odpowiedzialnym za jego retencję. Opisany proces można zatem przedstawić matematycznie ze pomocą zależności znanej w chromatografii jonowymiennej:

$$\log k = -s \log [C] + \text{const} \quad (6)$$

gdzie: s to współczynnik określający stosunek ładunków analitu i przeciwjonu, k - współczynnik retencji danego analitu, C - stężenie stosowanego buforu.

Jeżeli zatem za mechanizm retencji jest odpowiedzialna wymiana jonowa to powyższa zależność powinna mieć prostoliniowy przebieg i przechodzić przez początek układu współrzędnych.

Znaczący udział mechanizmu wymiany anionowej zaobserwowano dla sulfoamidów na kolumnie aminowej; natomiast retencja amidów na kolumnie była niezależna od stężenia octanu amonowego jako składnika fazy ruchomej (rys. 16) [66].

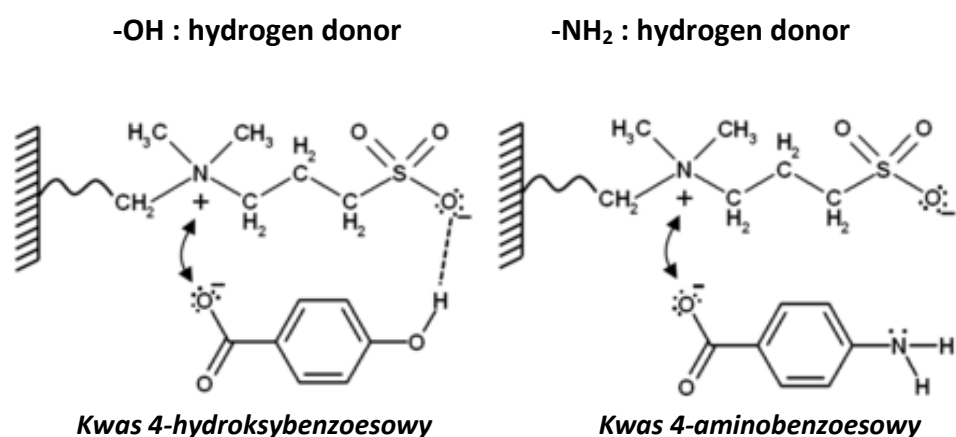


Rys.16. Wpływ stężenia octanu amonu na retencję amidów i sulfoamidów. Kolumna Altima Amino (4,6x250 mm, 5µm); faza ruchoma: ACN/octan amonowy (80:20, v/v), pH 6,0. [66].

1.1.1. Wiązania wodorowe

Zdolność związków do tworzenia wiązań wodorowych może mieć istotny wpływ na ich retencję w chromatografii HILIC. Wiązanie wodorowe może zostać utworzone między analitem a fazą stacjonarną, jeśli posiada ona zdolności do tworzenia tego typu wiązań. Fakt ten może być szczególnie istotny w próbach zwiększania efektywności rozdzielania analitów, które mogą oddziaływać elektrostatycznie a tworzenie wiązań wodorowych,

może dodatkowo wpływać na sprawność rozdzielania. Schemat tworzenia wiązań wodorowych jako dodatkowych oddziaływań między analitem a fazą stacjonarną przedstawiono na rysunku 17 na przykładzie fazy sulfobetainowej i metanolu jako składnika eluentu.



Rys. 17. Schemat tworzenia wiązania wodorowego na przykładzie sulfobetainowej fazy stacjonarnej (ZIC-HILIC) [67].

1.2. Wpływ temperatury na efektywność rozdzielania

Temperatura, w jakiej prowadzone jest rozdzielanie chromatograficzne ma istotny wpływ na jego efektywność [68-71]. Teoria chromatografii HILIC zakłada, że wraz ze wzrostem temperatury kolumny retencja analitów maleje. Jest to związane z osłabieniem wiązań wodorowych oraz innych oddziaływań między analitem a fazą stacjonarną. Podkreśla się jednak, że wpływ ten nie jest tak duży jak dla chromatografii w układzie faz odwróconych [72].

Zależność retencji analitów od temperatury można wyrazić za pomocą równania van't Hoffa:

$$\Delta G^0 = RT \ln K - \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (7)$$

Gdzie: ΔG^0 to zmiana entalpii swobodnej Gibbsa związana z retencją analitu, ΔH^0 - entalpia molowa związana z dynamiczną równowagą przechodzenia analitu pomiędzy fazą

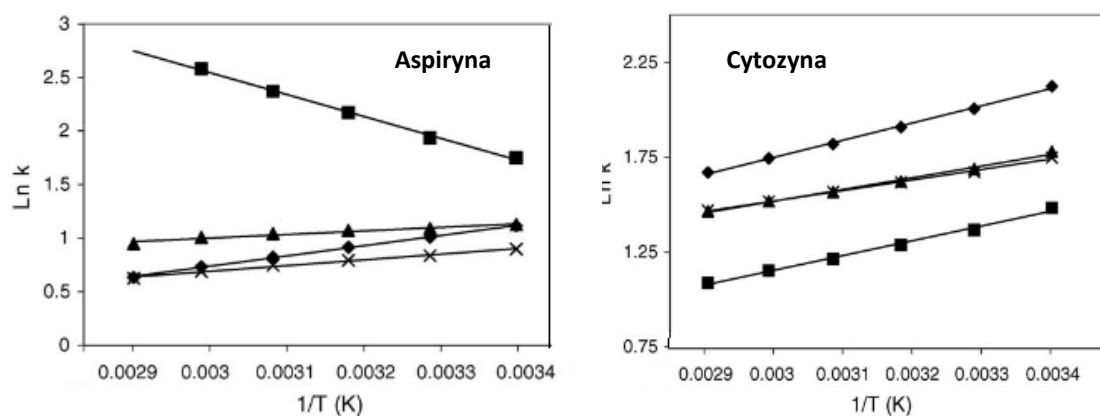
stacjonarną a ruchomą, ΔS^0 - standardowa entalpia molowa, T - temperatura wyrażona w kelwinach, R - stała gazowa.

Jeżeli mechanizm retencji jest warunkowany przez jeden rodzaj oddziaływań pomiędzy analitem a fazą stacjonarną (np. dominujący jest podział lub adsorpcja) to równanie to upraszcza się do postaci:

$$\ln k = \ln K + \ln \frac{V_s}{V_m} = -\frac{\Delta G^0}{RT} + \ln \frac{V_s}{V_m} = \frac{\Delta S^0}{R} + \ln \frac{V_s}{V_m} - \frac{\Delta H^0}{RT} = A_i + \left(\frac{B_i}{T}\right) \quad (8)$$

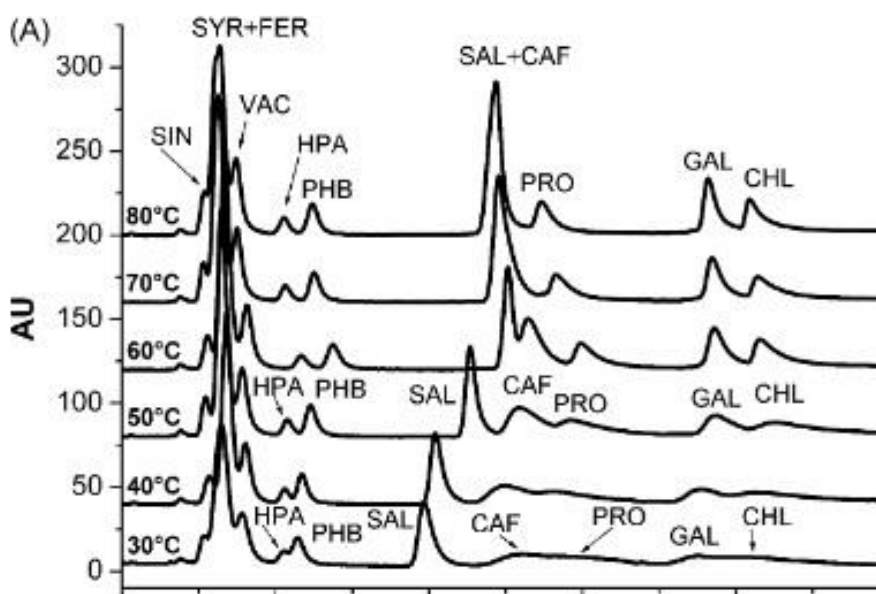
Jeśli retencja danego związku jest kontrolowana tylko przez jeden mechanizm w szerokim zakresie temperatur, zależność $\ln k$ od $1/T$ powinna być prostoliniowa [73]. Na podstawie równania (8) można w prosty sposób wyznaczyć wartość zmiany entalpii swobodnej Gibbsa dla danego rozdzielania, a tym samym określić czy jest ono samorzutne ($\Delta G^0 < 0$) czy wymuszone ($\Delta G^0 > 0$). Wartość zmiany entalpii reakcji (ΔH^0) można wyznaczyć ze współczynnika nachylenia wykresu (B_i), a zmianę entropii (ΔS^0) na podstawie współczynnika A_i .

Badania pokazują, że wpływ temperatury ściśle zależy od rodzaju analizowanych związków i nie jest on jednakowy dla wszystkich układów HILIC. Autorzy niektórych prac uzyskiwali liniową zależność równania van't Hoffa [51,60,71-74], a w niektórych przypadkach współczynnik korelacji liniowej był bardzo mały [79-81]. Odstępstwa od prostoliniowego przebiegu tej zależności mogą sygnalizować zmianę mechanizmu retencji lub mechanizm mieszany [72]. Zwykle uzyskuje się dodatni kąt nachylenia krzywych (ze wzrostem temperatury spada retencja), co wskazuje na ujemną wartość entalpii procesu. Jednak gdy występują oddziaływania na zasadzie wymiany jonowej, jest obserwowana odwrotna zależność, co ilustruje rysunek 18 [61]. Dla cytozyny dla wszystkich badanych kolumn uzyskano $\Delta H^0 < 0$. Dla aspiryny podobnie, choć wzrost temperatury powodował mniejsze zmiany retencji. Wyjątkiem są wyniki uzyskane dla kolumny aminowej, dla której zmiana entalpii była dodatnia.



Rys. 18. Zależności van't Hoffa dla aspiryny i cytozyny dla różnych kolumn: ♦ TSKgel Amide-80; ■ YMC-Pack NH₂; ▲ HILIC Silica; × ZIC-HILIC [61].

Wraz ze wzrostem temperatury otrzymano znaczącą poprawę efektywności rozdzielania mieszaniny kwasów polifenolowych z zastosowaniem monolitycznej kolumny MON-MEDSA-EDMA, jednak nie zaobserwowano znaczącego skrócenia czasów retencji analitów [50]. Za optymalną temperaturę prowadzenia analizy uznano 80°C (rys. 19).

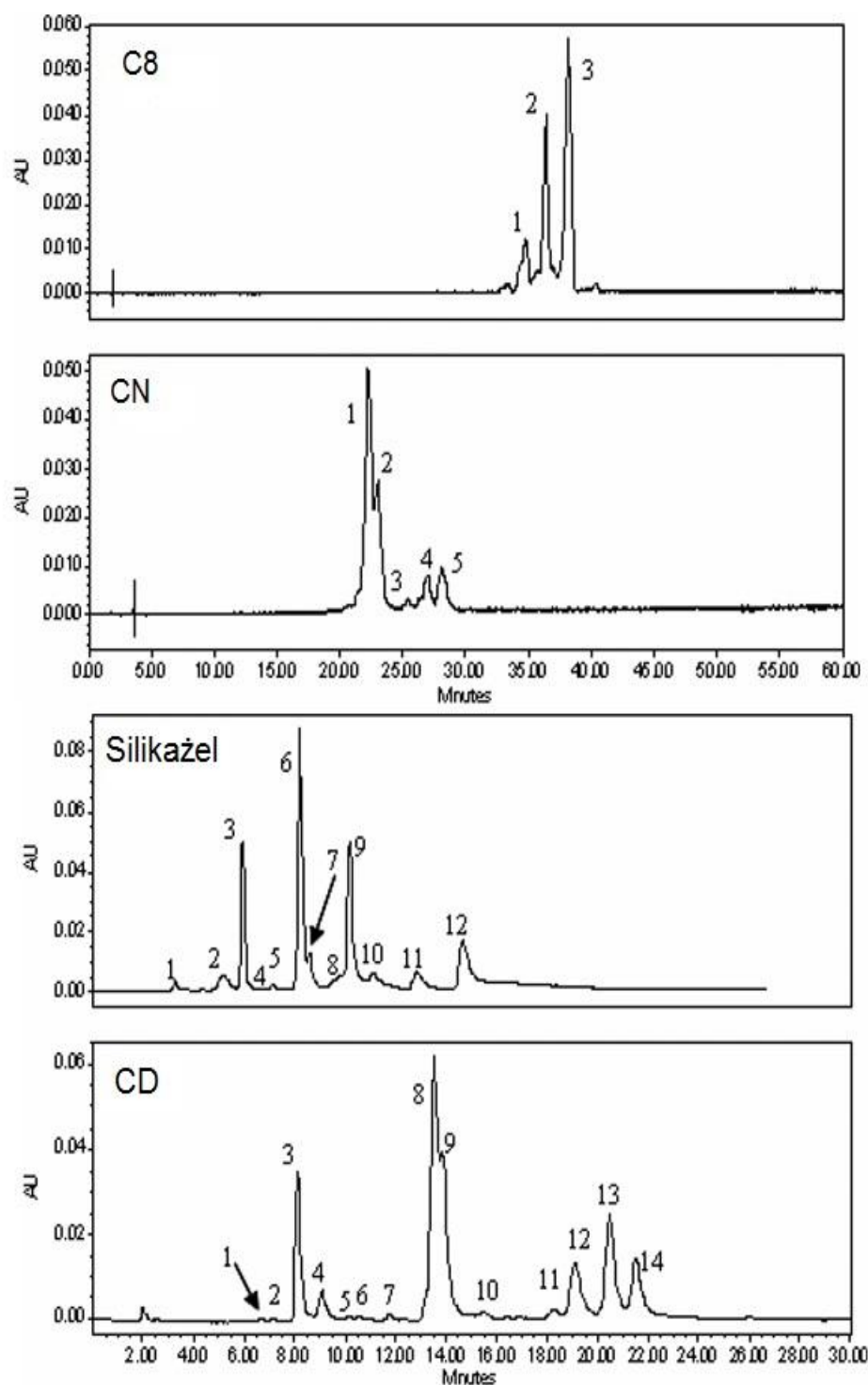


Rys. 19. Wpływ temperatury na efektywność rozdzielania kwasów polifenolowych [50].

1.5. Porównanie HILIC z innymi wariantami chromatografii ciekowej

Chromatografia oddziaływań hydrofilowych często jest uznawana za odmianę chromatografii w układzie faz normalnych, jednak trzeba zdawać sobie sprawę ze znaczących różnic pomiędzy tymi dwiema technikami separacyjnymi. Fazy ruchome stosowane w chromatografii HILIC zawierają znacznie większą ilość wody (2- 40%), co czyni je bardziej zbliżonymi do tych, stosowanych w chromatografii w układzie faz odwróconych. Rozdzielenia polarnych analitów z zastosowaniem NP-HPLC często cechuje niska efektywność oraz asymetryczne piki [73]. Problem ten został zminimalizowany w HILIC. Jeżeli dodatkowo pod uwagę weźmiemy możliwość połączeń typu HILIC-ESI/MS, to ta technika wydaje się być bardzo atrakcyjna [74]. Ze względu na dużą zawartość rozpuszczalników organicznych w fazie ruchomej, obserwowana jest bardziej wydajna efektywność jonizacji w źródle jonów spektrometru mas. W połączeniach typu NP-MS z reguły konieczne są dodatkowe zbiegi mające na celu zwiększenie efektywności jonizacji. Zalicza się do nich m. in. bezpośredni [75] lub pokolumnowy [76] dodatek substancji wspomagającej jonizację. Jednakże dodatkowa aparatura, która jest wymagana do przeprowadzenia wspomnianych zabiegów znacznie ogranicza użycie takich metod w rutynowych analizach.

Chromatografia oddziaływań hydrofilowych może być rozwiązaniem problemów z analizą polarnych związków z zastosowaniem RP-HPLC. Anality takie z reguły są niezatrzymywane przez hydrofobowe wypełnienie kolumny i wymywane w objętości martwej. Polarne fazy stacjonarne stosowane w HILIC gwarantują retencję takich związków. Przykładem może być rozdzielenie mieszaniny izoflawonów z zastosowaniem kolumn silikażelowej oraz cyklodekstrynowej (CD) w warunkach HILIC [19]. Ze względu na koelucję nie udało się rozdzielić tej mieszaniny z zastosowaniem chromatografii w układzie faz odwróconych z wykorzystaniem kolumn C8 oraz cyjanowej (CN) (rys. 20).



Rys. 20. Porównanie efektywności rozdzielania flawonoidów z zastosowaniem chromatografii w układzie faz odwróconych (kolumna C8 oraz CN) i chromatografii HILIC (kolumna silikażelowa i CD). Piki 1-14 na podstawie widm UV zostały uznane za flawonoidy [19].

Co więcej, specyficzny skład eluentów używanych w chromatografii oddziaływań hydrofilowych może znacznie ułatwić przygotowanie próbek z zastosowaniem ekstrakcji do fazy stałej (SPE). Próbkę wymyta ze złoża kolumnienki za pomocą rozpuszczalnika organicznego może być bezpośrednio poddana analizie z zastosowaniem HILIC. Nie byłoby to możliwe w RP-HPLC, ze względu na to, że rozpuszczalniki organiczne są najsilniejszymi eluentami w szeregu eluotropowym i ich moc elucyjna byłaby znacznie większa niż moc elucyjna fazy ruchomej. Skutkuje to pogorszeniem kształtów sygnałów i sprawności całego rozdzielania. Dodatkowym atutem chromatografii oddziaływań hydrofilowych w porównaniu do RP-HPLC, jest niskie ciśnienie na wlocie na kolumnę, spowodowane specyficznym składem fazy ruchomej z dużą zawartością rozpuszczalników organicznych.

1.6. Zastosowanie chromatografii oddziaływań hydrofilowych

Wraz ze wzrostem zainteresowania techniką chromatografii oddziaływań hydrofilowych, publikowanych jest coraz więcej prac traktujących o wykorzystaniu tej techniki w różnego typu analizach. Szeroki wachlarz zastosowań HILIC szczególnie akcentuje duży potencjał tej techniki. Podkreślana jest przy tym wyjątkowość tej techniki na tle pozostałych. Podkreśla się także znacznie bardziej długotrwałą optymalizację metody rozdzielania w odniesieniu do innych technik chromatograficznych. Przykłady zastosowań zestawiono w tabeli 3.

Tabela 3. Przykłady zastosowań chromatografii oddziaływań hydrofilowych.

Kolumna	Analizowane związki	Faza ruchoma	Detekcja	Literatura
TSK Gel Amide 80 ZIC-HILIC	Polarne związki w mięsie	Gradient octanu amonu w ACN	UV-Vis	[82]
ZIC-HILIC	Kwas askorbinowy	Elucja izokratyczna ACN/CH ₃ COOH (78/22, v/v)	UV-Vis	[83]
BEH Amide	Aminokwasy z ekstraktów roślin	Elucja gradientowa A: H ₂ O/ 5mM CH ₃ COONH ₄ / 5mM HCOONH ₄ /0,15% HCOOH B: ACN/ 1 mM CH ₃ COONH ₄ 1mM HCOONH ₄ /0,15% HCOOH	MS/MS	[84]
Betasil Silica Atlantis HILIC Hypersil	Loratadyna i deskarbo- etoksyloratadyna w próbkach krwi i moczu	Elucja gradientowa H ₂ O/ACN/CH ₃ COOH/TFA	MS/MS	[85]
X-Bridge Amide	Penicylina G, sulfonian streptomycyny w moczu	Elucja gradientowa: A: 10 mM CH ₃ COONH ₄ /ACN (1:1 v/v) B: 10 mM CH ₃ COONH ₄ /ACN (1:9 v/v)	MS	[86]
Z pokryciem poli- akryloamidowym (PAMS)	Zasady azotowe, nukleo- tydy, pochodne cukrów	Elucja gradientowa ACN/H ₂ O/0,2% HCOOH	UV-Vis	[87]
B- cyklodekstrynowa	Oligosacharydy	Elucja izokratyczna ACN/H ₂ O, (70/30 v/v)	UV-Vis refraktometryczna	[88]
<i>p</i> ZIC-HILIC	Flawonoidy w sokach cytrusowych	Elucja gradientowa A: H ₂ O, B: ACN	MS/MS	[16]

TSK Gel Amide 80	Formy specjacyjne selenu w drożdżach selenowych	Elucja izokratyczna ACN/H ₂ O+ 1 mM CH ₃ COONH ₄ +10mM CH ₃ COOH, (80/20, v/v)	Q-TOF-MS ICP-MS	[89]
Atlantis HILIC	Imidazole w kawie mielonej	Elucja izokratyczna A: MeOH; B: H ₂ O/ 0,1% HCOONH ₄ (80/20, v/v)	MS	[90]
Inertsil Diol	Kwas askorbinowy i jego pochodne w herbatach i suszonych owocach	Elucja izokratyczna A: ACN; B: 66.7 mM CH ₃ COONH ₄ , (85/15, v/v)	UV-VIS	[91]
ZIC-HILIC	Związki polifenolowe w ekstrakcie melisy	Elucja gradientowa A: 10 mM CH ₃ COONH ₄ B: ACN	MS/MS	[92]
The Nest Group HILIC*	Kwas foliowy i jego pochodne w próbkach krwi	Elucja izokratyczna A: ACN; B: 5 mM CH ₃ COONH ₄ , (75/25, v/v)	MS/MS	[93]
Luna HILIC Diol	Biomarkery nowotworowe w ludzkiej krwi i moczu	Elucja gradientowa A: 100 mM HCOONH ₄ B: ACN	MS	[94]
COSMOSIL HILIC	Imidazolidynylomocznik w kosmetykach	Elucja izokratyczna A: ACN; B: 10 mM CH ₃ COONH ₄ , (95/5, v/v)	DAD MS	[95]
Betasil SILICA	Metabolity morfiny Metabolity midazolamu	Elucja izokratyczna A: 0,1% TFA/H ₂ O B: 0,1 %TFA/ACN, (11/89, v/v) Elucja izokratyczna A: 0,05% TFA/H ₂ O B: 0,05 % TFA/ACN, (5/9, v/v)	MS/MS	[96]

Venusil Column	Melamina i jej pochodne w żywności	Elucja izokratyczna A: ACN; B: 10 mM CH ₃ COONH ₄ , (88/12, v/v)	MS	[97]
Discovery HS F5	Alkaloidy fenyloetylo- aminowe w produktach z cytrusów	Elucja izokratyczna A: 2 mM CH ₃ COONH ₄ B: ACN (10/90, v/v)	DAD	[98]
Atlantis HILIC	Pestycydy fosforoorgani- czne	Elucja izokratyczna A: ACN/IP; B: 0,2% HCOOH (95/5, v/v)	MS /MS	[99]

1.7. HILIC w chromatografii dwuwymiarowej (2D)

W ostatnim czasie można zauważyć ukierunkowywanie się chromatografii cieczowej na minimalizację kosztów analizy oraz maksymalne skrócenie czasu jej trwania. Dąży się także do poprawy jakości otrzymywanych wyników oraz obniżenia granicy wykrywalności dla analizowanych związków. Przy narzuconych przez kontrolę jakości standardach, chromatografia jednowymiarowa czasami okazuje się być niewystarczająca. Analiza w układzie jednowymiarowym pozwala na rozdzielanie związków tylko na podstawie jednej ich właściwości, zatem jednowymiarowa analiza chromatograficzna dużej liczby związków o podobnych właściwościach skutkuje uzyskiwaniem sygnałów cechujących się zbliżonymi wartościami czasów retencji, a więc zjawisku koelucji. W takich przypadkach konieczne jest przeprowadzenie analizy tej samej próbki na podstawie kilku jej właściwości. Takie postępowanie pociąga za sobą zwiększenie pojemności pików (ang. *peak capacity*) dla danego rozdzielania. Parametr ten definiuje się jako ilość pików chromatograficznych, która mieści się na chromatogramie w określonej jednostce czasu (z wykorzystaniem danej kolumny). Według Giddingsa [100], aby rozdzielić 98% sygnałów chromatograficznych, pojemność pików powinna być 100 razy większa od liczby składników występujących w analizowanej próbce. Z tego punktu widzenia osiągnięcie całkowitego rozdzielania próbki o złożonym składzie z zastosowaniem jednowymiarowej chromatografii staje się bardzo trudne, a w niektórych przypadkach wręcz niemożliwe. Wszystko to sprawia, że popularność technik chromatograficznych w dwóch wymiarach rośnie.

Ważnym parametrem cechującym chromatografię cieczową dwuwymiarową (2D) jest ortogonalność technik stosowanych w każdym wymiarze. Innymi słowy mechanizm rozdzielania w każdym z wymiarów powinien być znacząco różny, przez co obydwa rozdzielania charakteryzować się powinny inną selektywnością [101,102]. Ponieważ chromatografia oddziaływań hydrofilowych jest techniką komplementarną do chromatografii w układzie faz odwróconych, połączenie HILIC x RP-HPLC wydaje się być obiecującym narzędziem analitycznym. Jednakże sporym wyzwaniem jest „dopasowanie” składu faz ruchomych tak, aby ich moc elucyjna była odpowiednia w jednym i drugim wymiarze. Eluenty używane w HILIC są bardzo mocnymi elucyjnie w RP-HPLC i odwrotnie,

te o średniej mocy w chromatografii w układzie faz odwróconych są mocne w chromatografii oddziaływań hydrofilowych. Zatem stosowanie takiej samej fazy ruchomej w obydwu wymiarach powoduje uzyskiwanie niskich rozdzielczości oraz asymetrię pików [103]. Problem ten można jednak znacznie zminimalizować pracując w układzie *of-line*. W takiej konfiguracji frakcje rozdzielane w pierwszym układzie chromatograficznym są zbierane i analizowane w drugim, niezależnym układzie chromatograficznym. W praktyce często oznacza to wykonanie analizy w jednym wymiarze, wymianę i kondycjonowanie drugiej kolumny oraz kolejną analizę tej samej próbki, tym razem w wymiarze drugim. Mimo długiego czasu potrzebnego do przeprowadzenia całego rozdzielania, jak i ryzyka kontaminacji próbki między jednym a drugim wymiarem, ten wariant chromatografii 2D jest często stosowany [19,104-107]. Dużo bardziej skomplikowany i wymagający wyspecjalizowanej aparatury jest wariant *on-line* chromatografii dwuwymiarowej. Z wykorzystaniem takiego układu analiza chromatograficzna (rozdzielanie składników próbki) zachodzi w czasie rzeczywistym. Ze względu na automatyzację układu pomiarowego, czas pojedynczej analizy jest krótszy niż z wykorzystaniem techniki *off-line*. Sama konfiguracja układu pomiarowego zależy w tym przypadku od pomysłowości badacza oraz jego możliwości aparaturowych. W literaturze znaleźć można wiele sposobów prowadzenia tego typu analiz [108-113]. O tym, jak wielki potencjał posiada sprzężenie chromatografii oddziaływań hydrofilowych z chromatografią w układzie faz odwróconych świadczy szereg różnorodnych zastosowań takiego układu 2D. Kilka przykładów zestawiono w tabeli 4.

Tabela 4. Przykłady zastosowań chromatografii HILIC w układach typu 2D.

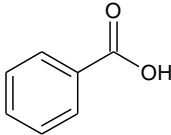
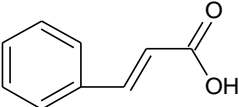
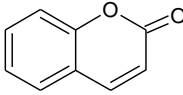
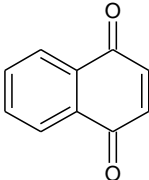
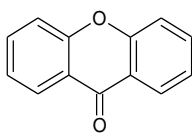
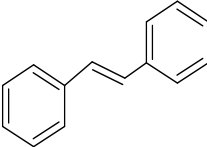
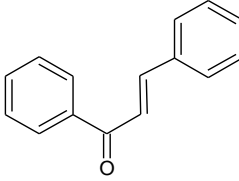
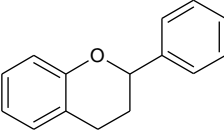
Układ 2D	Stosowane kolumny	Stosowane fazy ruchome	Analizowane próbki	Literatura
Połączenia typu <i>of-line</i>				
HILIC x RP	ZIC-HILIC x C18	1D: Elucja gradientowa ACN/ CH ₃ COONH ₄ 2D: Elucja gradientowa HCOOH/ACN	Białka w moczu	[114]
HILIC-HILIC	Click maltoza x TSK Gel Amide	1D: Elucja gradientowa ACN/ HCOOH 2D: Elucja gradientowa HCOOH/ACN	Polarne związki w ekstrakcie Carthamus tinctorius	[115]
RP-HILIC	C18 x β CD	1D: Elucja gradientowa HCOOH/ACN 2D: Elucja gradientowa ACN/HCOOH	Ekstrakty ziół stosowanych w medycynie chińskiej	[116]
RP-HILIC	C18 x Atlantis HILIC	1D: Elucja gradientowa TFA/ACN 2D: Elucja gradientowa ACN/HCOOH/TFA	Białka w hydrolizatach mleka	[117]
Połączenia typu <i>on-line</i>				
HILIC-RP	pZIC-HILIC x C18	1D: Elucja gradientowa ACN/ CH ₃ COONH ₄ 2D: Elucja gradientowa HCOOH/ACN	Bradykinina w mięśniach szczurów	[118]
HILIC-RP	ZIC-HILIC x C18	1D: Elucja gradientowa ACN/ CH ₃ COONH ₄	Neuropeptydy w mózgach szczurów	

		2D: Elucja gradientowa CH ₃ COOH/ACN		[119]
HILIC x RP	Ascentis Silica x C18	1D: Elucja gradientowa ACN/ HCOONH ₄ 2D: Elucja gradientowa TEAA/ACN	Oligonukleotydy	[120]
RP x HILIC	C18 x Luna HILIC oraz	1D: Elucja izokratyczna H ₂ O /AC 2D: Elucja gradientowa AC/H ₂ O	Niejonowe związki powierzchniowo aktywne	[121]
HILIC x RP	Luna HILIC x C18	1D: Elucja izokratyczna AC /H ₂ O 2D: Elucja izokratyczna H ₂ O/AC		

2. Związki polifenole: budowa i podział

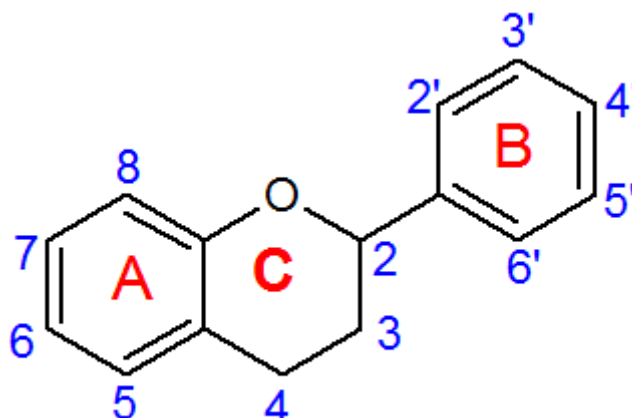
Związki polifenolowe to obszerna grupa substancji chemicznych będących wtórnymi metabolitami roślinnymi. Do tej pory zidentyfikowanych zostało 8000 tych związków [122]. Grupa ta obejmuje zarówno proste kwasy fenolowe, będące pochodnymi kwasu benzoowego oraz cynamonowego, flawonoidy, taniny i wiele innych. Cechą charakterystyczną tych związków jest występowanie w ich strukturze jednego lub wielu pierścieni aromatycznych oraz jednej lub kilku grup hydroksylowych. Przykładowych przedstawicieli związków polifenolowych przedstawia tabela 5.

Tabela 5. Struktura wybranych grup związków polifenolowych.

Kwasy benzoesowe	Kwasy hydroksycynamonowe	Kumaryny	Naftochinony
			
Ksantony	Stilbeny	Chalkony	Flawonoidy
			

Najbardziej zróżnicowaną, a zarazem największą grupą związków polifenolowych są flawonoidy. Początki badań nad tą grupą związków polifenolowych sięgają początku XX wieku. Dokładnie w latach 30-tych Albert Szent-Gyorgyi dokonał identyfikacji flawonoidów w owocach cytrusowych. Dotychczas opisano budowę ponad 4 000 związków z tej grupy. Jest ona szczególnie istotna z punktu widzenia badań stanowiących część eksperymentalną niniejszej pracy. Cechą wspólną budowy flawonoidów jest występowanie układu difenylopropanowego, na który składają się dwa pierścienie

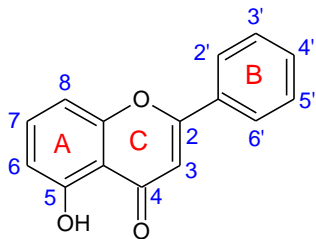
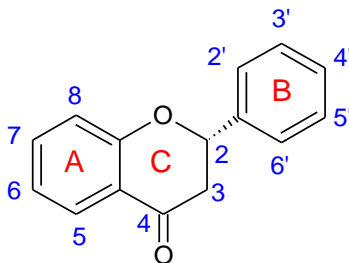
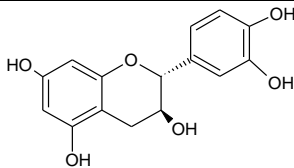
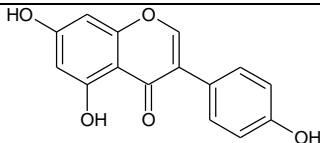
benzenowe, połączone pierścieniem piranu, pironu lub łącznikiem trójwęglowym. Główną strukturę flawonoidów przedstawiono na rysunku 21.



Rys. 21. Schemat struktury flawonoidów

Modyfikacje w obrębie heterocyklicznego pierścienia C prowadzą do powstania różnych związków flawonoidowych, takich jak flawony, flawon-3-ole, flawanony, flawan-3-ole, izoflawony, chalkony oraz antocyjanidyny. Flawonoidy wykorzystane w części eksperymentalnej niniejszej pracy, wraz z ich podziałem na odpowiednie grupy zestawiono w tabeli 6. Różnorodność tych związków wynika z możliwej obecności ugrupowań hydroksylowych, metoksyłowych, cukrów prostych powiązanych wiązaniem O- lub C-glikozydowym. Dodatkowo flawonoidy mogą tworzyć struktury dimeryczne takie jak: flawonolignany (pochodne flawanonolu – sylibina), czy estry katechiny (np. galusan epigallokatechiny) [123,124]. W tkankach roślinnych większość flawonoidów występuje (obok wolnych aglikonów) w postaci połączeń glikozydowych. W części cukrowej najczęściej występuje glukoza, ale możliwe jest także połączenie z galaktozą, ramnozą, ksylozą, arabinozą oraz kwasem glikuronowym. Cukry najczęściej przyłączone są do grupy hydroksylowej w pozycji C-7 we flawonach i izoflawonach, pozycji C-3 i C-7 w strukturach flawonoli oraz C-3 i C-5 w przypadku antocyjanidyn [123]. Glikozydy cechuje większa polarność od aglikonów, co tłumaczy ich dobrą rozpuszczalność w wodzie oraz dużo łatwiejsze przechodzenie przez błony komórkowe.

Tabela 6. Podział na podklasy flawonoidów użytych w części eksperymentalnej pracy.

Struktura	Podgrupa	Przykładowe związki						
	Flawony		3	7	2'	3'	4'	5'
		Chryzyna	H	OH	H	H	H	H
		Apigenina	H	OH	H	H	OH	H
	Flawon-3-ole (flawonole)	Luteolina	H	OH	H	OH	OH	H
		Kemferol	OH	OH	H	H	OH	H
		Moryna	OH	OH	OH	H	OH	H
		Mirycetyna	OH	OH	OH	H	OH	OH
		Ramnetyna	OH	OCH ₃	H	OH	OH	H
Kwercetyna	OH	OH	H	OH	OH	H		
Rutyna	O-rutynozyd	OH	H	OH	OH	H		
Kwercytryna	O-ramnozyd	OH	H	OH	OH	H		
	Flawanony		7	5	3'	4'		
		Naringenina	OH	OH	H	OH		
		Naringina	O-rutynozyd	OH	H	OH		
		Hesperetyna	OH	OH	OH	OCH ₃		
		Hesperydyna	O-rutynozyd	OH	OH	OCH ₃		
	Flawan-3-ole (katechiny)	Katechina						
	Izoflawony	Genisteina						

46

2.1. Rola związków polifenolowych w tkankach roślinnych i w organizmie człowieka

Etymologii wyrazu flawonoidy (*łac.* flavus-żółty) należy upatrywać w jednej z funkcji, jakie te związki pełnią w roślinach. Flawonoidy występują we wszystkich częściach roślin nadając im charakterystyczny dla danego gatunku kolor. To właśnie dzięki tym związkom poszczególne części roślin są widoczne dla roznoszących nasiona ptaków i zapylających je owadów. Ptaki dostrzegają przede wszystkim kolor czerwony, za który odpowiada obecność antocjanów. Barwa niebieska (warunkowana przez niebieskie antocyany) oraz żółta (flawony) przyciąga owady. Substancje te gromadzą się w powierzchniowych warstwach tkanek roślinnych (najczęściej w wakuolach). Dodatkowo związki polifenolowe pełnią w roślinach funkcje naturalnych fungicydów oraz chronią przed szkodliwym działaniem promieniowania ultrafioletowego. Są one także niezbędne do prawidłowego funkcjonowania rośliny, ponieważ pełnią rolę hormonów roślinnych, mają wpływ na wzrost oraz uczestniczą w przepływie energii.

Związki polifenolowe od dawna ceniono za ich właściwości prozdrowotne. Późniejsze badania dowiodły zdolności tych związków do neutralizacji wolnych rodników, hamowania peroksydacji lipidów, a nawet obniżenia aktywności enzymów. Najnowsze badania epidemiologiczne wyraźnie pokazują, że spożywanie produktów bogatych w związki polifenolowe zmniejsza ryzyko zachorowalności na choroby krążenia i serca, a nawet na choroby nowotworowe [125-128]. Jednakże sam metabolizm związków polifenolowych oraz mechanizm ich działania *in vivo* nie został jeszcze dokładnie poznany i wymaga wielu dalszych badań [129]. Mimo tego, nie ma wątpliwości co do pozytywnego wpływu związków polifenolowych na ludzki organizm. Zaowocowało to ich wykorzystaniem jako składników leków i suplementów diety. Związki o strukturze flawonoidowej wchodziły w skład preparatów leczniczych stosowanych w chorobach serca i zaburzeniach krążenia (rutyna, hesperydyna), schorzeniach wątroby (sylimaryna) oraz w celu łagodzenia objawów menopauzy (izoflawony).

2.2. Występowanie związków polifenolowych w żywności

Ze względu na prozdrowotne działanie związków polifenolowych zaczęto zwracać uwagę na ich obecność w codziennej diecie. Badania wykazały, że dzienne spożycie związków polifenolowych wynosi 780 mg w przypadku kobiet i 1058 g w przypadku mężczyzn. Przeszło połowę dziennego spożycia tych związków stanowią kwasy hydroksycynamonowe, 20-25% flawonoidy, a tylko 1% antocyjanidyny [130]. Najczęściej spotykanymi w przyrodzie flawonoidami są flawanole, szczególnie kwercetyna i jej glikozydy. Znaleźć je można w cebuli, herbacie, czerwonym winie czy owocach. Zawartość związków flawonoidowych w owocach czy warzywach zależy głównie od czynników środowiska: temperatury, nasłonecznienia, a także od ich stopnia dojrzałości. Produkty spożywcze bogate w związki polifenolowe przedstawia tabela 7.

Tabela 7. Występowanie związków polifenolowych w żywności [131].

Podgrupa flawonoidów	Źródło w pożywieniu
Flawanole	Jabłka, jagody, winogrona, cebula, sałata
Flawanony	Owoce cytrusowe
Flawonole	Jabłka, fasola, jagody, gryka, żurawina, cykoria, por, sałata, cebula, oliwa, pomidory, pieprz
Flawony	Owoce cytrusowe, seler, pietruszka, szpinak,
Izoflawony	Soja

Bogatym źródłem związków polifenolowych są także herbata, wino (szczególnie czerwone) oraz soki owocowe. Litry soku pomarańczowego zawiera 370-7100 mg związków polifenolowych, co oznacza, że szklanka takiego soku (250 mL) może dostarczyć od 100 mg do 1,8 g związków polifenolowych [132]. Warzywa zawierają nieco mniej

związków polifenolowych niż owoce, a sam sposób uprawy ma istotny wpływ na zawartość związków polifenolowych w warzywach; cebula z uprawy ekologicznej zawierała znacznie więcej flawonoidów niż ta z uprawy konwencjonalnej [133]. Związki polifenolowe są także składnikiem wielu dostępnych suplementów diety. Należy jednak pamiętać, że ich działanie zależy nie tylko od ich dziennego spożycia, lecz również od stopnia ich wchłaniania oraz dalszych przemian metabolicznych już w ludzkim organizmie.

3. Chromatograficzne oznaczanie związków polifenolowych

3.1. Wysokosprawna chromatografia cieczowa

Wysokosprawna chromatografia cieczowa jest najczęściej stosowaną techniką separacyjną w analizie związków polifenolowych. Najczęściej rozdzielanie prowadzi się w układzie faz odwróconych (RP-HPLC) z zastosowaniem kolumn C18 i faz ruchomych będących mieszaninami wody z acetonitrylem bądź metanolem. Coraz częściej, jako metodę detekcji stosuje się spektrometrię mas, która stopniowo zaczyna wypierać inne metody detekcji (np. metody spektrofotometryczne). Wykorzystanie trybów oferowanych przez spektrometrię mas, m. in. trybu SRM (ang. *Single Reaction Monitoring*) podwyższa czułość oznaczeń i jest często wykorzystywane w oznaczeniach ilościowych analizowanych związków. Dodatkowo spektrometria mas umożliwia przypisanie struktur związków polifenolowych wykrytych w próbkach o skomplikowanych matrycach. W ostatnim czasie pojawiło wiele prac przeglądowych poświęconych wykorzystaniu chromatografii cieczowej w analizie związków polifenolowych [134-137].

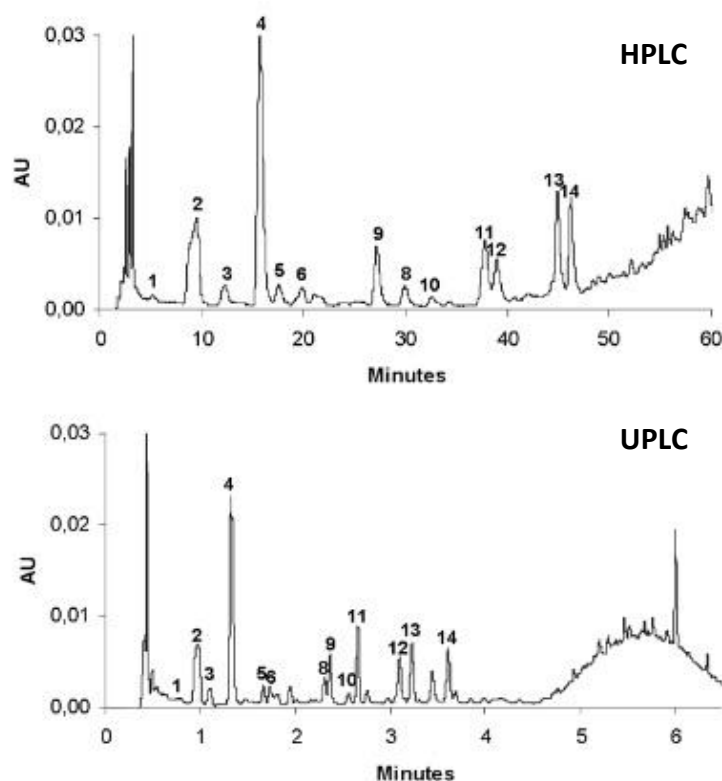
Częstym problemem w analizie związków polifenolowych jest zjawisko ich koelucji, nawet z zastosowaniem kolumn o wysokiej rozdzielczości. Dodatkowym mankamentem tej techniki w analizie związków polifenolowych jest długi czas pojedynczej analizy, wynoszący z reguły od 30 min do godziny. Harnly [138] przedstawił rozdzielanie flawonoidów wyekstrahowanych z owoców i orzechów, stosując mieszaninę metanolu, acetonitrylu i kwasu trifluorooctowego jako fazy ruchomej. Autorom udało się rozdzielić 20 związków polifenolowych w 60 minut. Sakakibara i współ. [139] opracowali metodę pozwalającą na rozdzielnie i ilościowe oznaczenie szeregu klas związków polifenolowych

w próbkach żywności, jednak czas pojedynczej analizy wynosił aż 95 minut. Chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas została także wykorzystana do analizy wybranych związków polifenolowych w naparach liści *Forsythia suspensa* zebranych w różnym okresie wegetacyjnym [140]. Autorzy tej pracy skupili się jednak na konkretnych pięciu wybranych związkach polifenolowych, zatem problemy napotykane w analizie chromatograficznej związków polifenolowych zostały ograniczone do minimum. Lee i współ. [141] przeprowadzili analizę związków polifenolowych w soku z aronii. Czas pojedynczej analizy w tym przypadku wynosił ok. 70 minut.

3.2. Ultrasprawa chromatografia cieczowa

Trend panujący od dłuższego czasu w chromatografii cieczowej to prowadzenie analiz z wykorzystaniem ziaren fazy stacjonarnej o coraz mniejszych średnicach $< 2\mu\text{m}$ [142]. Zaletami złożeń o małych średnicach są przede wszystkim wysoka efektywność rozdzieleń oraz możliwość skrócenia czasów analiz. Są to podstawy do tzw. szybkich analiz. Kosztem, jaki trzeba ponieść za cenę takiego rozdzielenia, jest wzrost ciśnienia na wlocie na kolumnę, które w analizach z zastosowaniem złożeń sub-2- μm jest większe niż 500 barów [143]. W przypadku klasycznych układów HPLC nie przekracza ono 400 barów.

W ostatnim czasie pojawia się coraz więcej prac poświęconych wykorzystaniu ultrasprawnej chromatografii cieczowej w analizie związków polifenolowych. Wiele z nich porównuje użycie HPLC z UHPLC, skłaniając się w stronę zasadności użycia w analizach kolumn o małych średnicach ziaren. Schwarz wraz ze współpracownikami [144] porównali RP-HPLC z wykorzystaniem kolumn C18 z ultrasprawną chromatografią cieczową, w której wykorzystana została kolumna UPLC BEH C18. Czas pojedynczej analizy udało się skrócić 10 razy z wykorzystaniem układu UPLC (z 60 min w przypadku HPLC do 6,4 min). Uzyskane chromatogramy przedstawiono na rysunku 22.



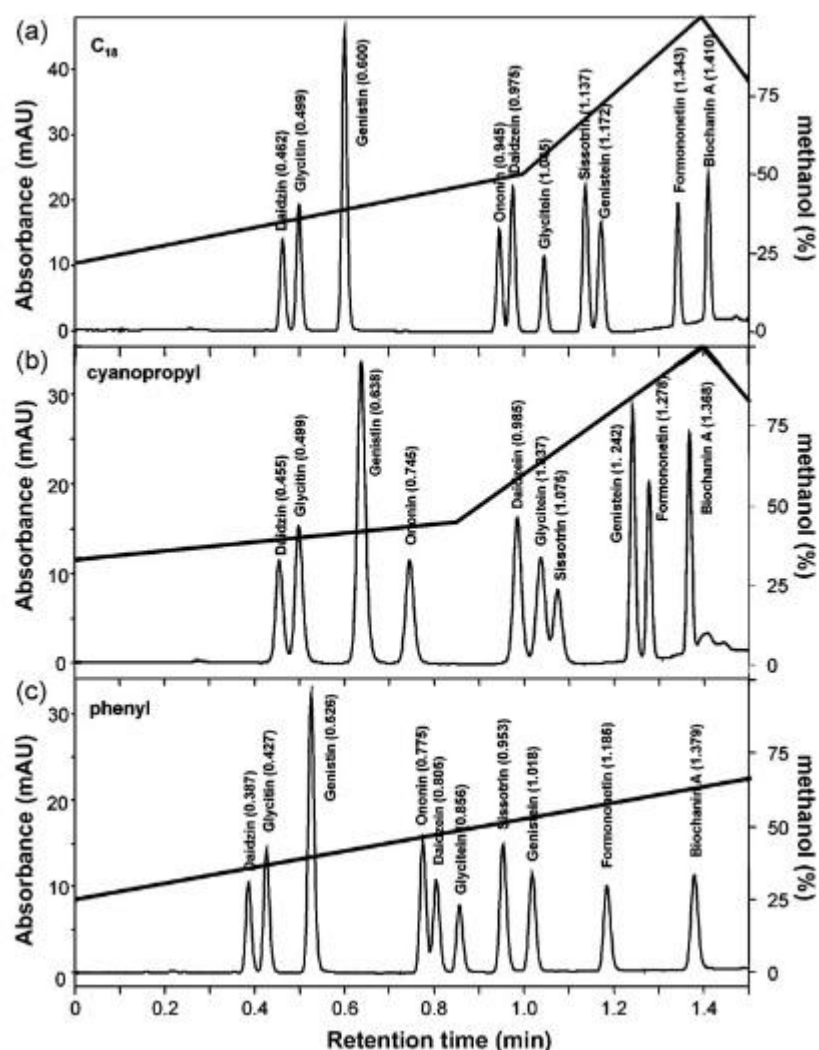
Rys. 22. Rozdzielenie związków polifenolowych w próbce brandy z zastosowaniem HPLC oraz UPLC [144].

Ortega [145] porównał rezultaty analiz procyanidyn w próbce kakao otrzymanych z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz normalnych (średnica stosowanej fazy stacjonarnej wynosiła 5 μm) i ultrasprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych (zastosowana kolumna HSS T3 o średnicy ziaren 1,8 μm). W obydwu przypadkach zastosowano tandemową spektrometrię mas jako metodę detekcji. Okazało się, że z zastosowaniem UHPLC czas analizy został skrócony do 12,5 min (z 80 min w przypadku klasycznego HPLC) z jednoczesną poprawą efektywności rozdzielania dla badanych związków. Podobne rezultaty zostały uzyskane przez de Villersa i wsp. [146]. W przypadku analizowanych przez nich procyanidyn w próbce kakao oraz flawonoidów w próbce zielonej herbaty, czas pojedynczej analizy udało się skrócić trzykrotnie, gdy zastosowano UHPLC. Guillarme i wsp. [147] wykorzystując kolumnę C18 o średnicy ziaren 1,7 μm opracowali metodę pozwalającą na rozdzielenie 8 katechin w zielonej herbacie w zaledwie 30s. Wydłużenie gradientu do 8 min, pozwoliło autorom

tej publikacji na osiągnięcie lepszej selektywności i rozdzielczości w odniesieniu do klasycznej analizy z wykorzystaniem kolumny C18. Coraz więcej prac dotyczy zastosowania UHPLC w analizie produktów spożywczych takich jak napary ziołowe i wina [144,148-151], owoce [152,153], ekstrakty roślinne [154,155], miód [156] oraz produkty mleczne [157]. Autorzy wszystkich prac prezentujących zastosowanie ultrasprawniej chromatografii cieczowej zwracają uwagę na krótki czas pojedynczych analiz, wysoką czułość oznaczeń oraz małe zużycie odczynników. Natomiast sam potencjał ultrasprawniej chromatografii cieczowej można zobrazować na przykładzie metody opracowanej przez Eprilati i wsp. [152], która pozwala na oznaczenie 135 związków polifenolowych w próbkach owoców, herbaty i wina w ok 15 minut.

3.3. Wysokotemperaturowa chromatografia cieczowa

W teorii chromatografii temperatura, w której prowadzone jest rozdzielenie wpływa na selektywność, retencję badanych związków oraz przede wszystkim na lepkość stosowanej fazy ruchomej. Wraz ze wzrostem temperatury maleje lepkość stosowanego eluentu, co daje możliwość zastosowania wyższych wartości przepływu fazy ruchomej a więc prowadzenia analiz w krótkim czasie. Trzeba jednak zwrócić uwagę na fakt, że zastosowanie dużych wartości przepływu w klasycznych układach do HPLC pociąga za sobą duży wzrost ciśnienia na wlocie na kolumnę. To sprawia, że rozdzielania w wysokiej temperaturze prowadzi się często z wykorzystaniem aparatury dedykowanej do UHPLC. Można zatem stwierdzić, że HTLC i UHPLC są technikami komplementarnymi. Znalazło to swoje przełożenie w analizie związków polifenolowych. Klejdus [158] przeprowadził rozdzielenie 13 izoflawonów w preparatach sojowych i ekstraktach roślinnych z wykorzystaniem kolumny Zobrax C18 w temperaturze 80 °C. Czas analizy wynosił 1 min. Ten sam zespół badawczy porównał efektywność rozdzielania mieszaniny kwasów polifenolowych i izoflawonów z zastosowaniem różnych faz stacjonarnych w ultrasprawniej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych [154]. Stwierdzono, że najlepszą efektywność rozdzielania uzyskano z zastosowaniem kolumny cyjanopropylowej o średnicy ziarna 1,8 µm w temperaturze 58 °C. Czas analizy dla próbki zawierającej 19 związków wynosił 1,9 minuty (rys. 23).



Rys 23. Porównanie efektywności rozdzieleń z zastosowaniem różnego typu faz stacjonarnych w wysokotemperaturowej chromatografii cieczowej [149].

3.4. Wielowymiarowa chromatografia w analizie flawonoidów

To, jakie wymagania stawiane są współczesnej chromatografii cieczowej w analizie związków polifenolowych, można zobrazować na przykładzie analizy procyjanidyn [159]. Związki te, obecne między innymi w winie, mogą występować zarówno w formie monomerów, oligomerów jak i polimerów. Należy wspomnieć, że stopień polimeryzacji tych związków rośnie wykładniczo. Meyer [159] zwraca uwagę, że same dimery procyjanidyn oparte na pierścieniu katechiny i epikatechiny mogą występować aż w 48

wariantach. Chcąc przeprowadzić kompleksową analizę danej próbki pod kątem występujących w niej procyanidyn, jak i pozostałych związków polifenolowych, występujących często w śladowych ilościach, potencjał oferowany przez techniki jednowymiarowe przestaje być wystarczający. Ograniczenie to dotyczy także wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Jednowymiarowa analiza chromatograficzna dużej liczby związków o podobnych właściwościach skutkuje uzyskiwaniem sygnałów cechujących się zbliżonymi wartościami czasów retencji, a więc zjawisku koelucji. W takich przypadkach konieczne jest przeprowadzenie analizy tej samej próbki w wielu wymiarach a więc przeprowadzenie jej rozdzielania na podstawie kilku jej właściwości. Mimo znacznie bardziej skomplikowanych rozwiązań aparaturowych w stosunku do jednowymiarowej chromatografii, chromatografia dwuwymiarowa (2D) staje się obiecującym narzędziem pracy w analizie związków polifenolowych. Dodatkowym atutem tej techniki jest to, że rozdzielanie w każdym wymiarze przebiega według ortogonalnego mechanizmu w stosunku do drugiego. Dwuwymiarową analizę chromatograficzną w trybie *on-line* wykorzystano w analizie próbek piwa, wina i naparów ziołowych [160-162]. We wszystkich trzech przytoczonych przypadkach wykorzystano chromatografię w układzie faz odwróconych (RP-LC) w obydwu wymiarach. Działanie to ma na celu głównie zwiększenie pojemności pikowej dla danego rozdzielania. Jednak nie jest to jedyne możliwe połączenie. Wykorzystano także połączenie chromatografii oddziaływań hydrofilowych (HILIC) z chromatografią w układzie faz odwróconych (RP-LC) w analizie wspomnianych wcześniej procyanidyn w próbce kakao oraz ekstrakcie z jabłek [163]. Autorzy pracy zwracają uwagę na wykorzystanie przez nich ortogonalności tych dwóch technik chromatograficznych. Podczas rozdzielania procyanidyn w pierwszym wymiarze (z wykorzystaniem chromatografii HILIC), związki są rozdzielane w oparciu o ich polarność. W przypadku procyanidyn oznacza to dłuższą retencję związków zawierających w swojej budowie więcej grup hydroksylowych. Można więc powiedzieć, że w tym etapie następuje rozdzielanie poszczególnych izomerów. W przypadku rozdzielania tych analitów w drugim wymiarze (z zastosowaniem chromatografii w układzie faz odwróconych) związki są rozdzielane w oparciu o ich hydrofobowość. Zatem związki mające więcej grup hydroksylowych w cząsteczce są słabo zatrzymywane na kolumnie, co przekłada się na ich krótkie czasy retencji (odwrotnie niż w analizie w pierwszym wymiarze). Połączenie HILIC-

RPLC w trybie *off-line* zostało także zastosowane w analizie związków polifenolowych w zielonej herbacie [104]. Zauważono, że retencja związków w pierwszym wymiarze, przeprowadzonym z użyciem chromatografii oddziaływań hydrofilowych rośnie wraz ze wzrostem ilości podstawników cukrowych w cząsteczce, natomiast mono-, di- i triglikozydy są rozdzielane w wymiarze drugim z wykorzystaniem chromatografii w układzie faz odwróconych.

4. Metody detekcji związków polifenolowych

Ze względu na zdolność związków polifenolowych do absorpcji promieniowania UV-Vis detekcja spektrofotometryczna jest najczęściej stosowaną techniką do ich detekcji [164-167]. Kwasy fenolowe oznaczane są przy długości fali 280 nm. Natomiast każda podgrupa flawonoidów oznaczana jest przy innej długości fali, np. flawonole i izoflawony w zakresie 330–370 nm, flawonony przy 280 nm, a antocyjaniny przy 530–580 nm. Jednakże ze względu na podobną budowę oraz możliwość występowania izomerycznych form związków polifenolowych (np. różne położenie podstawnika hydroksylowego niepowodujące znaczących różnic w widmie UV-VIS), otrzymywane widma nie zawsze były jednoznaczne do zinterpretowania. Między innymi przez to metod spektrofotometrycznych nie można określić jako selektywnych. W analizie próbek o skomplikowanych matrycach, szczególnie próbek naturalnych, jest to niezwykle istotne.

Detekcja fluorymetryczna jest bardziej czuła niż detekcja UV-VIS [164,168]. Przy zastosowaniu detektora fluorymetrycznego otrzymano wartość granicy wykrywalności aż o rząd wielkości mniejszą w przypadku kwasów wanilinowego, syringinowego i 4-kumarowego [164]. Wiele flawonoidów tworzy kompleksy z jonami metali jak np. Al(III), Mg(II), Be(II), Zn(II), Sc(III), Ga(III), In(III), które wykazują fluorescencję. Reakcje takie zostały wykorzystane do detekcji fluorymetrycznej flawonoidów zawierających układ 3-hydroksy-4-keto z wykorzystaniem reakcji podkolumnowej [168].

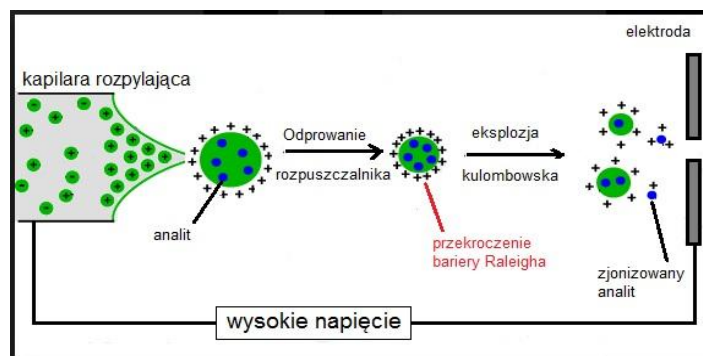
Ze względu na zdolność związków polifenolowych do ulegania reakcjom redoks możliwa jest ich detekcja z zastosowaniem detektora elektrochemicznego [169]. Znacznym ograniczeniem tych metod detekcji jest brak informacji o strukturze związku, adsorpcja produktów reakcji redox na powierzchni elektrody oraz brak możliwości stosowania elucji gradientowej. To sprawia, że w ostatnich latach obserwuje się wzrost

zastosowań spektrometrii mas jako metody detekcji związków polifenolowych w połączeniu z technikami rozdzielczymi. Identyfikacja analitów jest dokonywana nie tylko na podstawie czasu retencji, lecz przede wszystkim w oparciu o widma mas lub widmo fragmentacyjne (układy tandemowej MS/MS).

4.1. Spektrometria mas w analizie związków polifenolowych

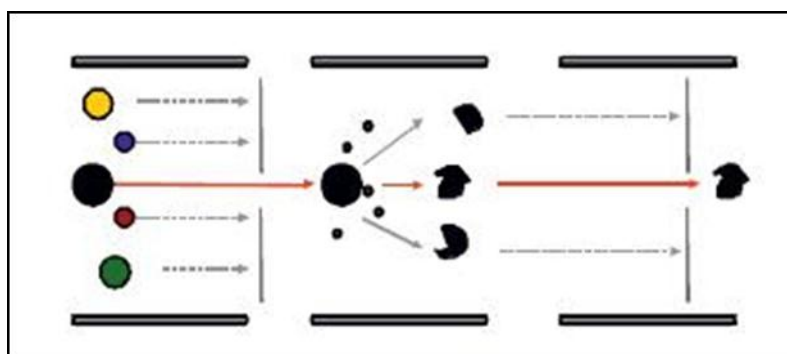
Ważnym etapem w całym procesie detekcji z wykorzystaniem spektrometrii mas jest jonizacja analitu. W analizie związków polifenolowych najczęściej stosuje się jonizację poprzez elektrorozpylanie w polu elektrycznym (ESI, *Electrospray Ionization*) oraz jonizację chemiczną pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI, *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*). W literaturze można znaleźć informacje, że efektywność jonizacji aglikonów jest porównywalna z zastosowaniem obydwu źródeł [170]. Dla glikozydów natomiast znacznie bardziej efektywne okazuje się elektrorozpylanie.

Część eksperymentalną niniejszej pracy wykonano stosując elektrorozpylanie jako metodę jonizacji związków polifenolowych. W tej metodzie jonizacji analit jest wprowadzany w formie ciekłej do kapilary, do której przyłożono wysokie napięcie. Powoduje to rozpylenie drobnych, wielokrotnie naładowanych kropeł. Kolejnym krokiem jonizacji jest odparowanie rozpuszczalnika, na skutek czego kropla ulega skurczeniu. Dzieje się tak aż do momentu osiągnięcia przez nią bariery Raleigha, czyli nagromadzenia się maksymalnego ładunku na powierzchni kropli. Wtedy następuje rozerwanie kropli, które uwalnia zjonizowany analit. Następnie trafia on do analizatora mas. Schemat jonizacji z zastosowaniem ESI przedstawia rysunek 24.



Rys. 24. Schemat jonizacji analitu za pomocą elektrorozpylania ESI.

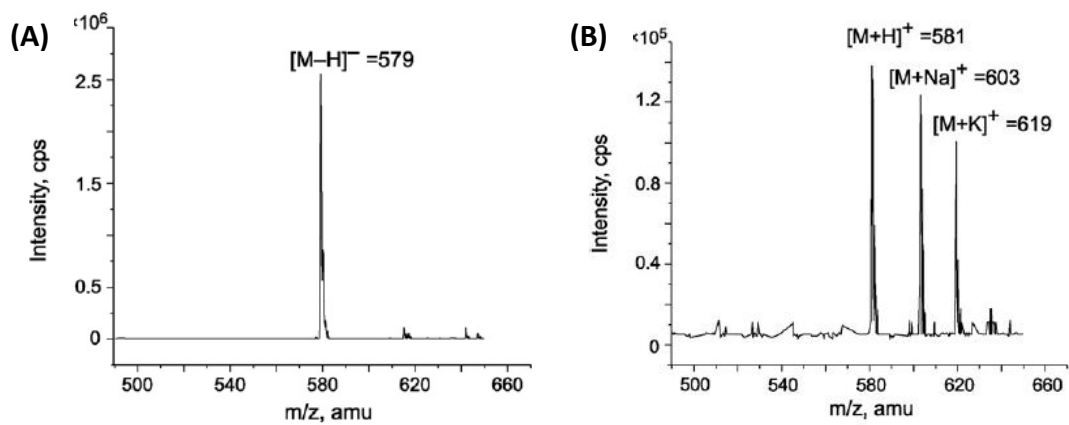
Analizator mas segreguje jony według stosunku masy do ładunku (m/z), wykorzystując do tego pole magnetyczne. Ze względu na zakres analizowanych mas, dokładność oraz rozdzielczość, wyróżnia się różne typy analizatorów mas. Najczęściej stosowanymi są analizator kwadrupolowy, pułapka jonowa oraz analizator czasu przelotu (TOF). Kwadrupolowy analizator mas pozwala na identyfikację analitów na podstawie monitorowania wybranego jonu (tryb SIM, *Single Ion Monitoring*). Jednakże aby zwiększyć czułość tego trybu często stosuje się tzw. układ tandemowy. Są to trzy, połączone szeregowo pojedyncze analizatory kwadrupolowe, przy czym środkowy z nich pełni funkcję komory zderzeń. Taką metodę detekcji zastosowano w części eksperymentalnej tej pracy, pracując w trybie monitorowania wybranych reakcji (SRM). Tryb ten polega na wybraniu analitu o konkretnej wartości m/z w analizatorze pierwszym i skierowaniu go do drugiego analizatora, gdzie następuje jego fragmentacja. Jon fragmentacyjny, charakterystyczny dla wartości m/z wybranej w pierwszym analizatorze, trafia do detektora (rys. 25). Ze względu na wysoką specyficzność reakcji fragmentacji, możliwe jest oznaczenie kilku analitów, które są wymywane w tym samym czasie retencji.



Rys 25. Schemat pracy spektrometru mas w trybie SRM.

Polifenole mogą ulegać jonizacji poprzez przyłączenie protonu (jony pseudomolekularne $[M+H]^+$) lub poprzez oderwanie protonu (jony pseudomolekularne $[M-H]^-$). Przy jonizacji w trybie jonów dodatnich oprócz jonu pseudomolekularnego $[M+H]^+$ flawonoidów powstają dodatkowo inne jony (np. addukty z jonami sodu i potasu) o dużej intensywności. W przypadku jonizacji w trybie jonów ujemnych sygnał pochodzący od

analitu ma wyższą intensywność niż ten otrzymany w wyniku protonowania, gdyż zwykle nie są obserwowane addukty (rys. 26).



Rys. 26. Widmo mas naringiny otrzymane w trybie jonów (A) ujemnych oraz (B) dodatnich [171].

CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

5. Aparatura i stosowane odczynniki

Odczynniki stosowane do badań

- Acetonitryl, czystość chromatograficzna, Merck
- Amoniak, czystość chromatograficzna, Merck
- Kwas mrówkowy, cz.d.a. POCH
- Metanol, czystość chromatograficzna, Merck
- Octan amonu, cz. d. a., Odczynniki Chemiczne Lublin
- Woda dejonizowana, Milipore Mili – Q Plus System

Odczynniki wykorzystywane do sporządzania roztworów wzorcowych

- Apigenina, cz.d.a., Sigma-Aldrich
- Chryzyna, cz.d.a., Sigma-Aldrich
- Genisteina, cz.d.a., Sigma-Aldrich
- Hesperetyna, cz.d.a, Sigma-Aldrich
- Hesperydyna, cz.d.a., Sigma-Aldrich
- Katechina, cz.d.a., Sigma-Aldrich
- Kemferol, cz.d.a., Sigma-Aldrich
- Kwercetyna, cz.d.a., Sigma-Aldrich
- Kwercytryna, cz.d.a, Sigma-Aldrich
- Luteolina, cz.d.a., Sigma-Aldrich
- Mirycetyna, cz.d.a., Sigma-Aldrich
- Moryna, cz.d.a., Sigma-Aldrich
- Naringenina, cz.d.a., Sigma-Aldrich
- Naringina, cz.d.a., Sigma-Aldrich
- Ramnetyna, cz.d.a., Sigma-Aldrich
- Rutyna, cz.d.a., Sigma-Aldrich

Aparatura pomiarowa

- Chromatograf cieczowy, Shimadzu, Japonia, składający się z:

- kontrolera CBM20A,
- pomp wysokociśnieniowych LC20-AD,
- degazera DGU-20A5,
- autosamplera SIL 20,
- termostatu kolumny CTO-20AC,

Stosowane detektory

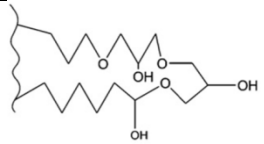
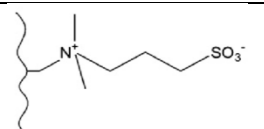
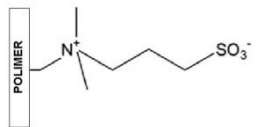
- detektor UV SPD 20A,
- Spektrometr mas 3200 QTRAP (Applied Biosystem/MDS SCIEX, Kanada),
źródło jonów: ESI

Wykorzystywane kolumny chromatograficzne:

- Atlantis HILIC, Waters (Milford, MA, USA)
- Luna HILIC, Phenomenex (Wiedeń, Austria)
- ZIC-HILIC, SeQuant, Merck, (Darmstadt, Niemcy)
- *p*ZIC-HILIC, SeQuant, Merck, (Darmstadt, Niemcy)

Dokładną charakterystykę kolumn zestawiono w tabeli 8.

Tabela 8. Charakterystyka stosowanych kolumn.

Kolumna	Grupa funkcyjna	Wymiary (mm)	Wielkość ziarna (μm)	Wielkość porów (\AA)	Powierzchnia złoża m^2/g
Silikażelowa (Atlantis HILIC)	Brak modyfikacji	2.1 x 100	3.0	100	332
Diolowa (Luna HILIC)		2.0 x 100	3.5	200	200
Dwubiegunowa "zwitterionic" (ZIC-HILIC)		2.1 x 100	3.0	100	135
Dwubiegunowa "zwitterionic" (pZIC-HILIC)		2.1 x 100	5.0	200	-

5.1 Warunki prowadzenia analizy chromatograficznej

W zależności od etapu badań do elucji analitów wykorzystano mieszanie acetonitrylu lub metanolu z roztworem kwasu mrówkowego (8 mmol/L pH 2,8) lub octanem amonu (pH 7 lub 9 o różnych stężeniach: 5, 10 oraz 15 mM), a także z wodą. Eluenty odgazowywano przed analizą przez 30 min w płuczce utradźwiękowej. Faza ruchoma była dozowana na kolumnę z prędkością przepływu równą 0,2 mL/min. Objętość wstrzykiwanej próbki wynosiła 5 μ l.

Próbki naturalne analizowano wykorzystując metodę gradientową według programu przedstawionego w tabeli 9. Analizę ilościową przeprowadzono wykorzystując krzywe kalibracji roztworów wzorcowych flawonoidów i kwasów polifenolowych o stężeniach: 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 15 mg/L. Ekstrakty próbek naturalnych przed analizą filtrowano stosując membranowe filtry strzykawkowe o średnicy porów 0,45 μ m.

Tabela 9. Warunki elucji gradientowej stosowane w analizie próbek naturalnych z wykorzystaniem HPLC-MS.

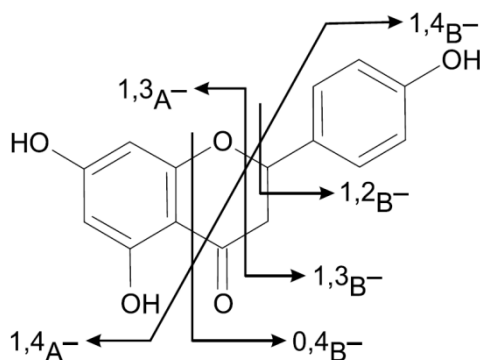
Czas [min]	Zawartość % ACN w eluencie
4	98
6	90
8	80
8,4	50
13	98
20	98

W celu identyfikacji związków rejestrowano widma MS, stosując jako metodę jonizacji elektrorozpylanie. Widma były zbierane w zakresie m/z od 50 do 1650 w trybie jonów ujemnych. Napięcie na kapilarze w źródle jonów wynosiło -4,5 kV. Temperaturę w źródle jonów ustalono na 450 °C, ciśnienie gazu kurtynowego wynosiło 0,3 MPa. Kolumna chromatograficzna była termostatowana w temperaturze 30°C (wyłączając pomiary wpływu temperatury na efektywność rozdzielania).

6. Wyniki i ich dyskusja

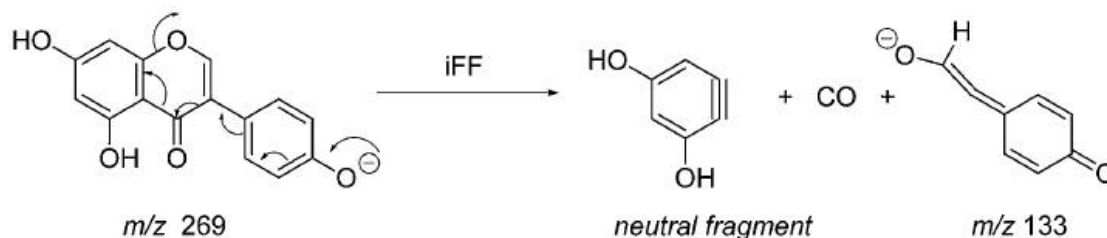
6.1. Optymalizacja pracy spektrometru mas

Badania rozpoczęto od optymalizacji parametrów pracy spektrometru mas pod kątem detekcji wybranych flawonoidów. Optymalizację reakcji fragmentacji wybranych flawonoidów przeprowadzono w trybie *infusion*. Widma zbierano w zakresie m/z od 50 do 650. Przeprowadzono fragmentację wybranych jonów pseudomolekularnych i zarejestrowano widma mas jonów potomnych. Stopień fragmentacji cząsteczki zależy od wartości energii kolizji (CE). W przypadku fragmentacji glikozydów, użycie niewielkiej energii kolizyjnej powoduje oderwanie cząsteczki cukru. Świadczy to o tym, że wiązanie glikozydowe jest najsłabszym wiązaniem w cząsteczce glikozydu. Dalsza reakcja fragmentacji przebiega podobnie jak dla aglikonów. Fragmentacja flawonoidów może polegać na utracie małych fragmentów cząsteczki typu CO, H₂O lub CH₃. Z reguły jednak kluczowe w ich reakcji fragmentacji jest rozpad w obrębie pierścienia C [172]. Głównym mechanizmem, według którego zachodzi rozpad pierścienia C jest mechanizm Retro Dielsa-Adlera (RDA). Przykładowy schemat reakcji fragmentacji dla naringeniny, przedstawiono na rysunku 27.



Rys. 27. Schemat fragmentacji cząsteczki naringeniny [172].

Nieco inną ścieżkę fragmentacji mogą mieć izoflawony podstawione w pozycji 4' grupą hydroksylową [173]. Wtedy możliwa ścieżka ich fragmentacji przebiega według schematu przedstawionego na rysunku 28.



Rys. 28. Schemat reakcji fragmentacji dla genisteiny według fragmentacji specyficznej dla flawonoidów (iFF- isoflavonoid specific fragmentation) [173].

Ustalono optymalne warunki oznaczania flawonoidów z zastosowaniem spektrometrii mas zestawiono w tabeli 10.

Tabela 10. Warunki oznaczania flawonoidów za pomocą spektrometru mas.

Nazwa związku	Q1 [amu]	Q3 [amu]	DP [V]	CE [eV]
Chryzyna*	255	153	81	37
Apigenina	269	117	55	32
Genisteina	269	133	75	52
Hesperetyna	301	164	80	52
Hesperydyna	609	164	85	72
Katechina	289	109	45	34
Kemferol	285	151	45	25
Kwercetyna	301	151	40	30
Kwercytryna	447	300	60	30
Luteolina	285	133	60	44
Mirycetyna	317	151	20	26
Moryna	301	125	55	30
Naringenina	271	119	45	34
Naringina	579	271	80	52
Ramnetyna	315	165	35	30
Rutyna	609	300	65	56

*Jonizacja w trybie jonów dodatnich

6.2. Wyznaczenie logarytmów hydrofobowości analizowanych flawonoidów

Cechą związku chemicznego mającą kluczowe znaczenie w chromatografii oddziaływań hydrofilowych jest jego polarność. Parametr ten jest szczególnie przydatny przy przewidywaniu retencji związków. Hydrofilowy podział, który zgodnie z teorią powinien być głównym mechanizmem retencji w chromatografii HILIC, zakłada podział analitu między dwie ciecze: wodę zaadsorbowaną na powierzchni złoża oraz niepolarny eluent o dużej zawartości rozpuszczalników organicznych. Powinowactwo analitu do tych faz określa jego lipofilowość. Parametr ten charakteryzuje powinowactwo analitu do warstwy lipidowej i wodnej, a jego miarą jest stosunek równowagowych stężeń substancji rozpuszczonej w obydwu tych, niemieszających się ze sobą fazach. Stosunek ten w warunkach stałego ciśnienia i temperatury, jest wielkością stałą i nazywaną zgodnie z prawem Nernsta współczynnikiem podziału. W określaniu lipofilowości danego związku najczęściej wykorzystuje się układ *n*-oktanol/woda, a wartość współczynnika podziału określa zależność:

$$P = C_{ok} / C_w \quad (9)$$

gdzie: C_{okt} stężenie substancji w warstwie oktanolowej (mol/L), C_w stężenie substancji w warstwie wodnej (mol/L).

W przewidywaniu retencji związków w chromatografii HILIC, wykorzystywane są najczęściej logarytmy z lipofilowości (logP). Im większa wartość logarytmu, tym związek bardziej lipofilowy, czyli mniej polarny. Istnieje wiele metod wyznaczania tego parametru. Klasyczną metodą było wprowadzenie znanego stężenia analitu do układu *n*-oktanol/woda, wytrząsanie układu i po ustaleniu się stanu równowagi wyznaczenie stężeń substancji w obydwu fazach. Dziś najczęściej stosowanymi metodami są metody obliczeniowe, bazujące na mechanice kwantowej (np. program QSRR-Quantitative Structure-Retention Relationship). Jednak w zależności od tego, jakie przybliżenia zastosujemy i na jak dokładny wariant obliczeń się zdecydujemy, otrzymujemy bardzo różne wyniki. Na użytek tej pracy logP zostały policzone z wykorzystaniem programu Molinspiration Property Engine, który oparty jest jedynie na strukturze związków. Wyniki

te zestawiono z otrzymanymi z programu QSRR, opierającego się zarówno na strukturze, jak i naprężeniach występujących w cząsteczce (tabela 11). Zamieszczono także literaturowe wartości logP dla badanych flawonoidów.

Tabela 11. Zestawienie logP badanych związków.

Związek	logP		
	Program Molinspiration	Program QSRR	Dane literaturowe
Chryzyna	2,943	2,382	0,08 [176]
Apigenina	2,463	1,635	2,92 [175] 2,20[177]
Genisteina	2,268	1,650	3,04 [175] 2,82 [177]
Hesperetyna	1,935	1,804	2,30 [174]
Hesperydyna	-1,13	-1,321	1,18 [179]
Katechina	-1.370	0,482	0,45 [174]
Kemferol	2,172	1,043	2,69 [174] 3,11 [175] 3,35 [178]
Kwercetyna	1,683	0,380	2,74 [174, 178] 1,82 [175]
Kwercytryna	0,644	-0,595	0,64 [175]
Luteolina	1,974	0,956	3,22 [175]
Mirycetyna	1,392	-0,283	2,83 [174] 1,84[178]
Moryna	1,881	1,804	1,97 [174] 1,27 [178]
Naringenina	2,117	1,649	2,59 [174] 1,68 [177] 2,09 [178]
Naringina	-0.370	-1,421	2,60 [175]
Ramnetyna	2.219	1,189	-
Rutyna	-1,063	-2,345	-0,71 [178]

Ze względu na duże rozbieżności między poszczególnymi wartościami logP liczonymi różnymi metodami w dalszej części pracy uwzględniono wartości obliczone programem Molinspiration Property Engine. Zrezygnowano z danych uzyskanych z programu QSRR, ze

względu na brak logicznego związku faktycznej polarności związków z ich wartościami w obrębie całej grupy.

Częstym zarzutem pojawiającym się przy badaniu mechanizmu retencji związków z wykorzystaniem ich logP jest fakt, że parametr ten nie uwzględnia pH eluentu, który jest stosowany podczas danej analizy. Parametrem, który uwzględnia wartość pH, w którym prowadzone jest rozdzielanie, jest logD, który uwzględnia ewentualną jonizację analitów. Zależność między log P a log D dla danego analitu przedstawia równaniem 10:

$$\log D_{acids} = \log P + \log \left[\frac{1}{1 + 10^{pH - pK_a}} \right] \quad (10)$$

gdzie pH jest pH stosowanego eluentu, pK_a – ujemnym logarytmem z wartości stałej dysocjacji dla danego związku.

W praktyce jednak znacznie częściej stosuje się logP. Jest to spowodowane między innymi faktem, że nie zawsze znane są wartości pK_a dla wszystkich analizowanych związków. Ponad to w zależności od sposobu wyznaczania wartości pK_a dla związków pojawiają się bardzo duże rozbieżności (tabela 12). Poza tym logP wystarczająco dobrze odzwierciedla polarność danego analitu, a ta jest kluczowym parametrem w przewidywaniu retencji w chromatografii HILIC.

Tabela 12. Zestawienie wartości pK_{a1} badanych związków.

Związek	pK_{a1}
Chryzyna	8,00 [180]
Apigenina	7,08 [181]
Genisteina	7,84 [181]
Hesperetyna	6,67 [182]
Katechina	8,68 [183]; 8,16 [184]; 4,6 [182]
Kemferol	6,96 [183]; 8,20 [182]
Kwercetyna	7,10 [183]; 5,87 [183]; 6,74 [182]; 8,45 [180]

Luteolina	5,99 [185]
Moryna	4,97 [183]; 5,20 [180]; 3,46 [180]
Naringenina	7,03 [181]; 7,50 [180]
Rutyna	4,3 [182]

6.3. Wyznaczenie czasu martwego dla stosowanych kolumn

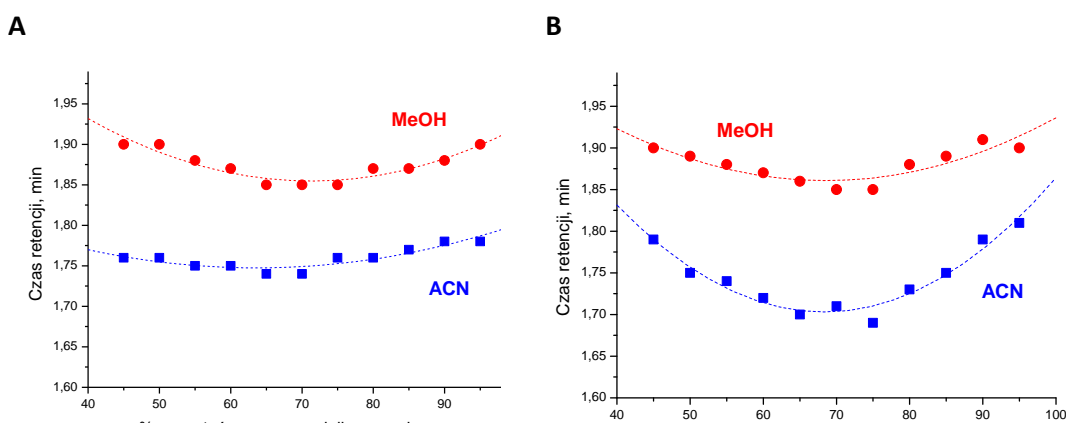
W celu wyznaczenia czasu martwego kolumny posłużono się roztworem wzorcowym toluenu w acetonitrylu o stężeniu 5 mg/L. Rejestrowano chromatogramy dla wzorca w całym zakresie składu faz ruchomych, w których planowano kontynuować badania dla docelowych flawonoidów, czyli od 95 do 45% rozpuszczalnika organicznego w eluencie. Badania prowadzono w dwóch wartościach pH składnika wodnego (2,8 oraz 7), wykorzystując ACN i MeOH. Jedynie stosując kolumnę *p*ZIC-HILIC rozdzielanie przeprowadzono w pH 9. Wyniki uzyskane dla czterech stosowanych kolumn przedstawiono w tabeli 13.

Tabela 13. Czasy martwe wyznaczone dla stosowanych kolumn.

% rozpuszczalnika organicznego	Atlantis-HILIC		Luna-HILIC		ZIC-HILIC		pZIC-HILIC	
	Czas retencji [min]							
	ACN	MeOH	ACN	MeOH	ACN	MeOH	ACN	MeOH
45	1,76	1,90	1,79	1,90	1,53	1,52	2,14	2,12
50	1,76	1,90	1,75	1,89	1,53	1,52	2,14	2,12
55	1,75	1,88	1,74	1,88	1,52	1,52	2,14	2,12
60	1,75	1,87	1,72	1,87	1,53	1,52	2,14	2,12
65	1,74	1,85	1,70	1,86	1,53	1,52	2,14	2,12
70	1,74	1,85	1,71	1,85	1,53	1,52	2,14	2,12
75	1,76	1,85	1,69	1,85	1,53	1,52	2,14	2,12
80	1,76	1,87	1,73	1,88	1,53	1,52	2,14	2,12
85	1,77	1,87	1,75	1,89	1,53	1,52	2,14	2,12
90	1,78	1,88	1,79	1,91	1,53	1,52	2,14	2,12
95	1,78	1,90	1,81	1,90	1,53	1,52	2,14	2,12

W przypadku kolumn o złożu sulfobetainowym (ZIC-HILIC i *p*ZIC-HILIC) wartość czasu martwego jest wartością stałą, niezależną od procentowej zawartości rozpuszczalnika organicznego w eluencie; nieznacznie dłuższa, gdy jako składnika eluentu użyto ACN, a pH fazy ruchomej nie wpływało na czas retencji wzorca. Inaczej przedstawia się sytuacja dla kolumny silikażelowej (Atlantis) i diolowej (Luna). Kolumna diolowa zaliczana jest do złożów mogących być wykorzystywanymi zarówno w chromatografii HILIC jak i w chromatografii w układzie faz odwróconych. To, według jakiego mechanizmu przebiega rozdzielanie zależy głównie od zawartości rozpuszczalnika organicznego w fazie ruchomej. Jeżeli pracujemy z eluentem o dużej zawartości rozpuszczalnika organicznego, to pracujemy w trybie HILIC. I odwrotnie, stosując eluent o małej zawartości rozpuszczalnika organicznego, pracujemy w trybie RP. Efektem tego podwójnego mechanizmu rozdzielania jest uzyskiwanie krzywych zależności współczynników retencji analitów od zawartości rozpuszczalnika organicznego w eluencie o charakterystycznym kształcie litery U.

Takie charakterystyczne przebiegi krzywych były obserwowane dla toluenu - markera czasu martwego (rys. 29). Charakterystyczne minimum przypada na 75% acetonitrylu bądź metanolu w fazie ruchomej. Analogiczną sytuację obserwowano w przypadku zastosowania kolumny krzemionkowej, jednakże tutaj minimum funkcji jest bardziej „wyplaszczone” i obejmuje przedział od 70 do 65% zawartości rozpuszczalnika organicznego



Rys. 29. Zależność czasu martwego od procentowej zawartości rozpuszczalnika organicznego w eluencie dla kolumny A) Atlantis HILIC oraz B) Luna HILIC.

6.4. Kolumna Atlantis HILIC

6.4.1. Wpływ pH i zawartości rozpuszczalnika organicznego w fazie ruchomej na retencję flawonoidów

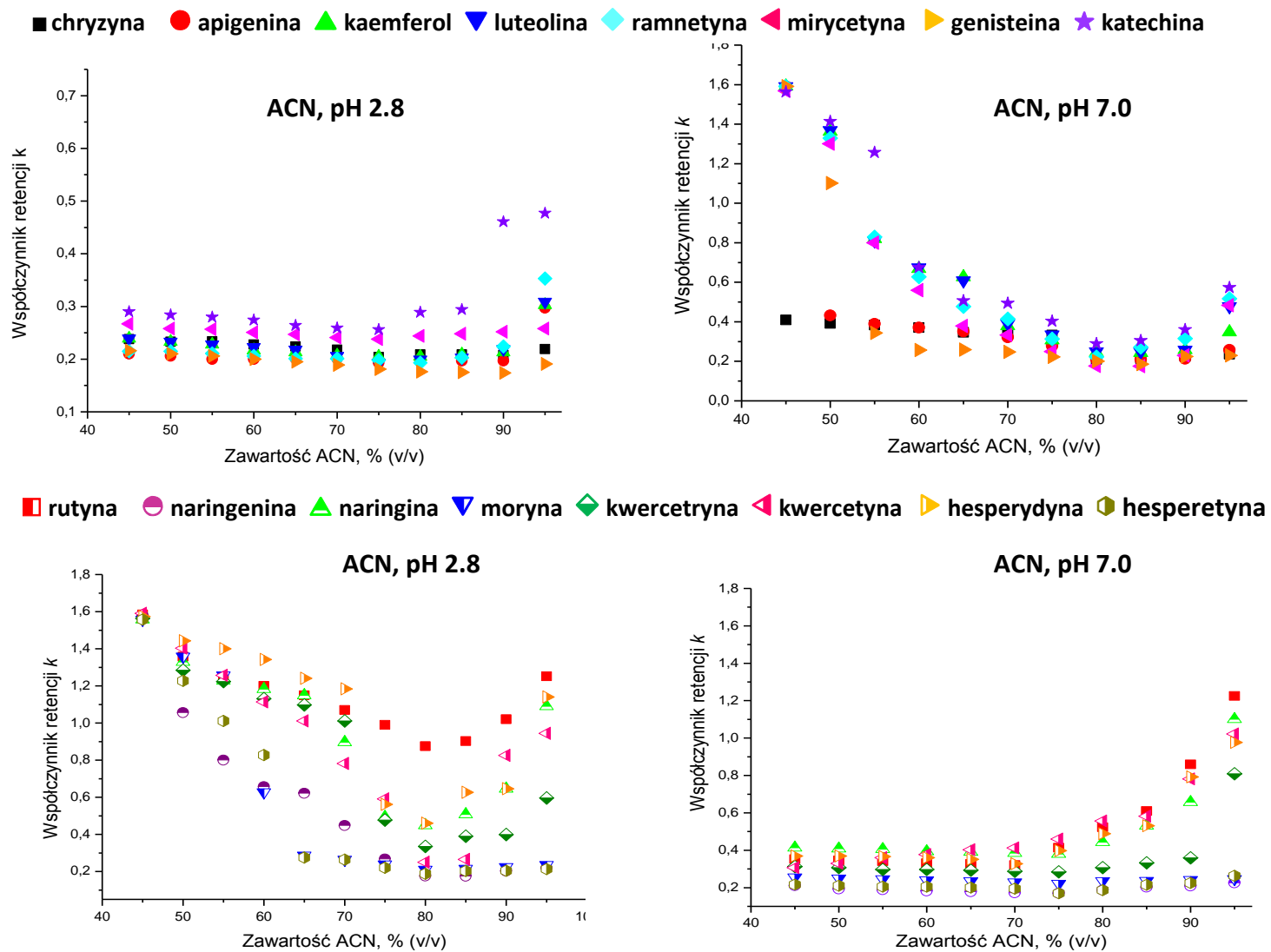
Wpływ pH fazy ruchomej badano dla dwóch wartości pH 2,8 oraz 7. Wartości te odnoszą się do składnika wodnego fazy ruchomej. W pH 7 flawonoidy są częściowo zdysocjowane (zależnie od ich wartości pKa), co powoduje wzrost ich polarności. Można zatem przypuszczać, że w tych warunkach czasy retencji flawonoidów powinny być dłuższe niż w pH 2,8, gdy są w formie sprotonowanej. Zatem wraz ze wzrostem pH, przy założeniu, że głównym mechanizmem rozdzielania na kolumnie krzemionkowej jest hydrofilowy podział analitu między warstwę wodną, zadsorbowaną na powierzchni hydrofilowego złoża a niepolarny eluent, powinniśmy obserwować wzrost retencji związków. Analizując wyniki otrzymane z zastosowaniem acetonitrylu jako składnika fazy ruchomej, hipoteza ta potwierdza się szczególnie dla aglikonów (rys. 30). Wraz ze wzrostem pH ich czasy retencji ulegają nieznacznemu wydłużeniu. W przypadku glikozydów (bardziej polarnych) nie zaobserwowano istotnego wpływu pH fazy ruchomej na ich retencję. Może to sugerować, że mechanizm retencji bardziej polarnych flawonoidów nie opiera się jedynie na hydrofilowym podziale. Grupy silanolowe, które mogą oddziaływać z analitami w pH 7 są już zdysocjowane (dla reakcji $SiOH_2^+ \rightarrow SiOH + H^+$ pKa wynosi -2,77, natomiast dla reakcji $SiOH \rightarrow SiO^- + H^+$ pKa wynosi 6,77 [186]). Powoduje to, że na powierzchni krzemionki tworzy się wypadkowy ładunek ujemny, który może elektrostatycznie oddziaływać z analitami. W takiej sytuacji mechanizm retencji będzie wypadkową hydrofilowego podziału i słabych oddziaływań elektrostatycznych.

Czasy retencji aglikonów ulegają wydłużeniu wraz ze wzrostem pH eluentu również wtedy, gdy jako składnik fazy ruchomej został zastosowany metanol. Alkohol ten, ze względu na swoje podobieństwo do wody, jest uznawany za eluent o dużej sile elucji w chromatografii HILIC. Ma on także zdolność do tworzenia wiązań wodorowych, przez co może oddziaływać z grupami silanolowymi krzemionki. Prawdopodobnie ta jego

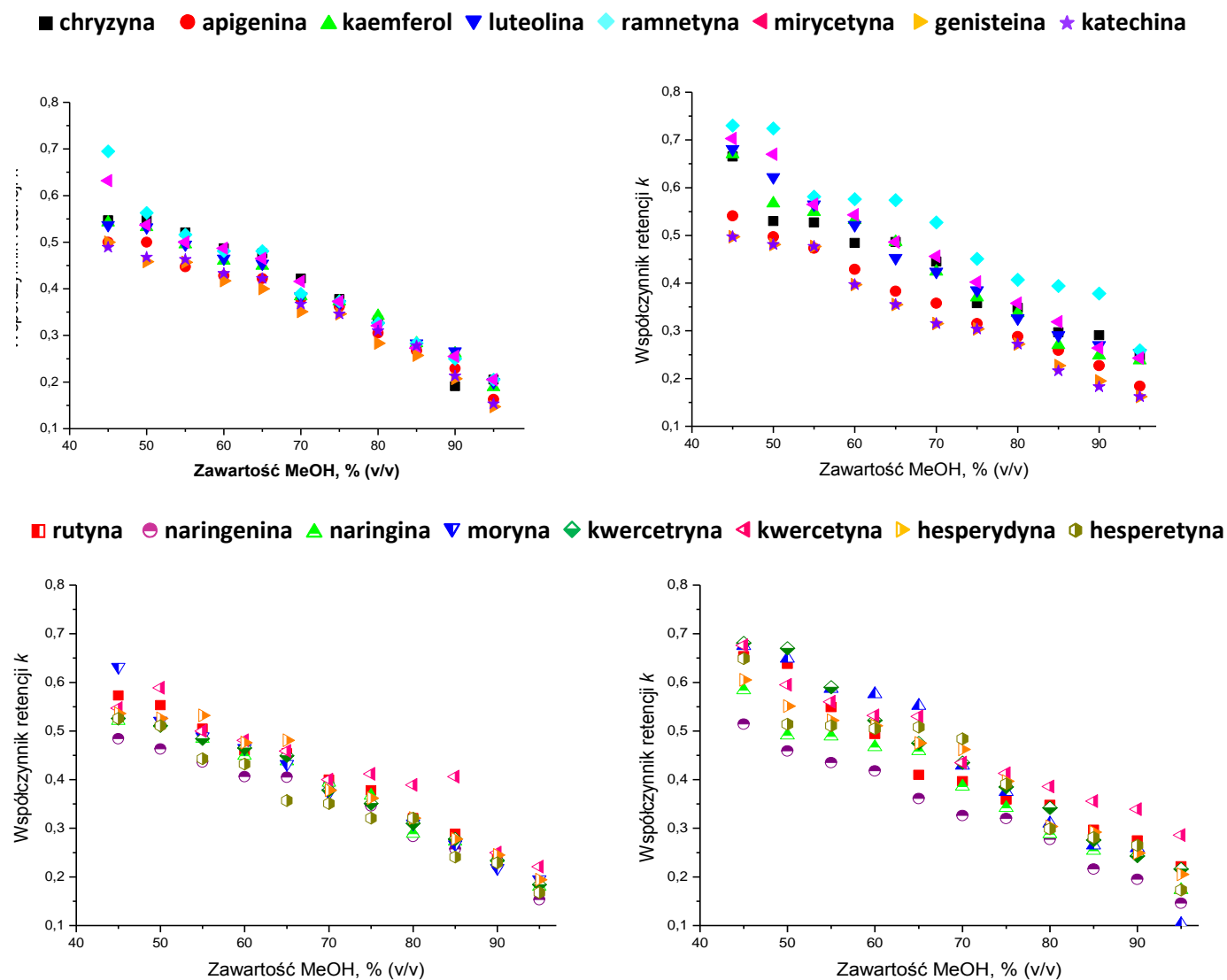
zdolność jest odpowiedzialna za znaczne skrócenie czasów retencji glikozydów wraz ze wzrostem pH fazy ruchomej.

Wpływ zależności zawartości rozpuszczalnika organicznego w eluencie na wartości współczynników retencji badanych związków przedstawiono na rys. 30-31. W przypadku acetonitrylu, podobnie jak dla toluenu, uzyskane krzywe miały kształt litery U (rys. 30). Taki kształt zależności współczynników retencji od zawartości rozpuszczalnika organicznego w fazie ruchomej obrazuje, zgodnie z danymi literaturowymi [57-60], przejście z trybu RP do trybu HILIC. Kryje się za tym zmiana dominującego mechanizmu retencji z adsorpcji (charakterystycznej dla chromatografii w układzie faz odwróconych) do hydrofilowego podziału (utożsamiany z HILIC). Można wnioskować, że powyżej 70% (minimum krzywej) acetonitrylu w eluencie dominującym mechanizmem retencji będzie podział analitu, poniżej 70% przeważać będzie adsorpcja. Dla najmniej polarnych związków (chryzyna i apigenina) otrzymane wartości współczynników retencji prawie nie zmieniają się przy wzroście zawartości acetonitrylu w fazie ruchomej.

Podobnego kształtu krzywej nie obserwuje się stosując metanol, jako składnik faz ruchomych (rys. 31). W tym przypadku, ze wzrostem jego zawartości w eluencie retencja flawonoidów maleje. Jak wspomniano wcześniej, metanol ze względu na swoje podobieństwo do wody, może wypierać jej cząsteczki w wytworzonej warstwie, obniżając jej polarność. Prowadzi to do skrócenia retencji analitów ulegających hydrofilowemu podziałowi, dla których warstwa wodna przestaje być atrakcyjniejsza pod względem polarności od eluentu. Ponad to, ze względu na zdolność tworzenia wiązań wodorowych, może on oddziaływać bezpośrednio z powierzchnią złoza, utrudniając dostęp analitów do jego powierzchni.



Rys. 30. Zależność współczynników retencji flawonoidów od zawartości acetonitrylu w fazie ruchomej dla kolumny silikażelowej

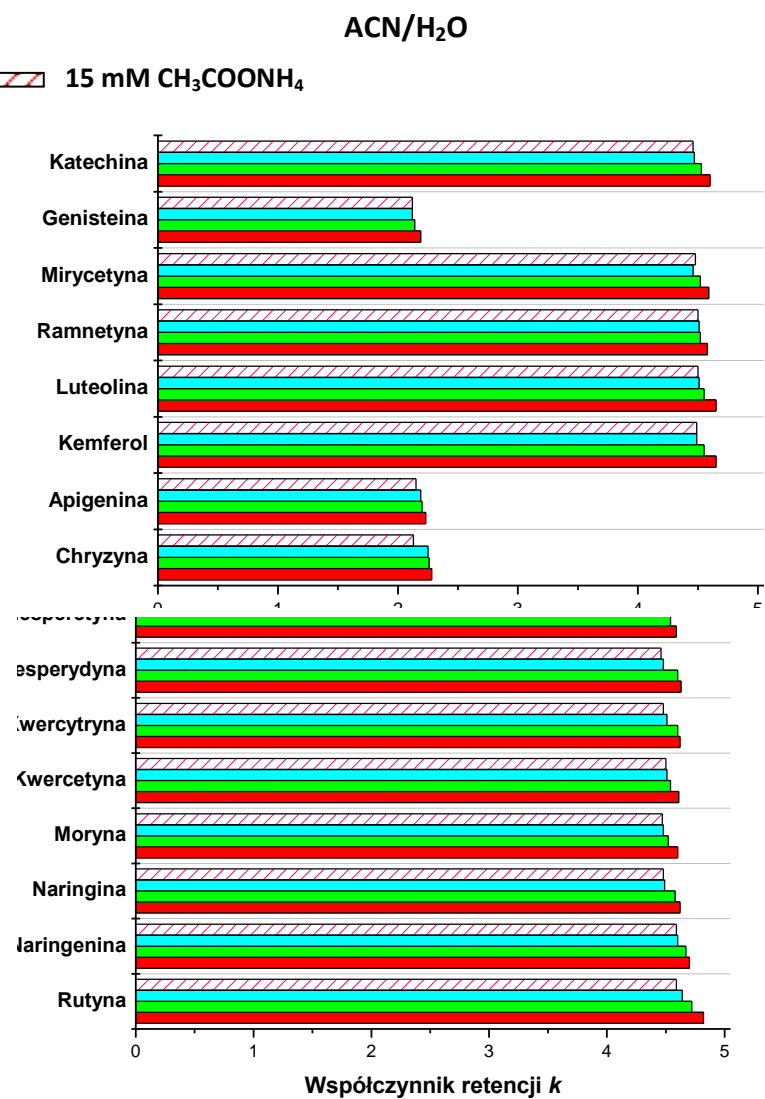
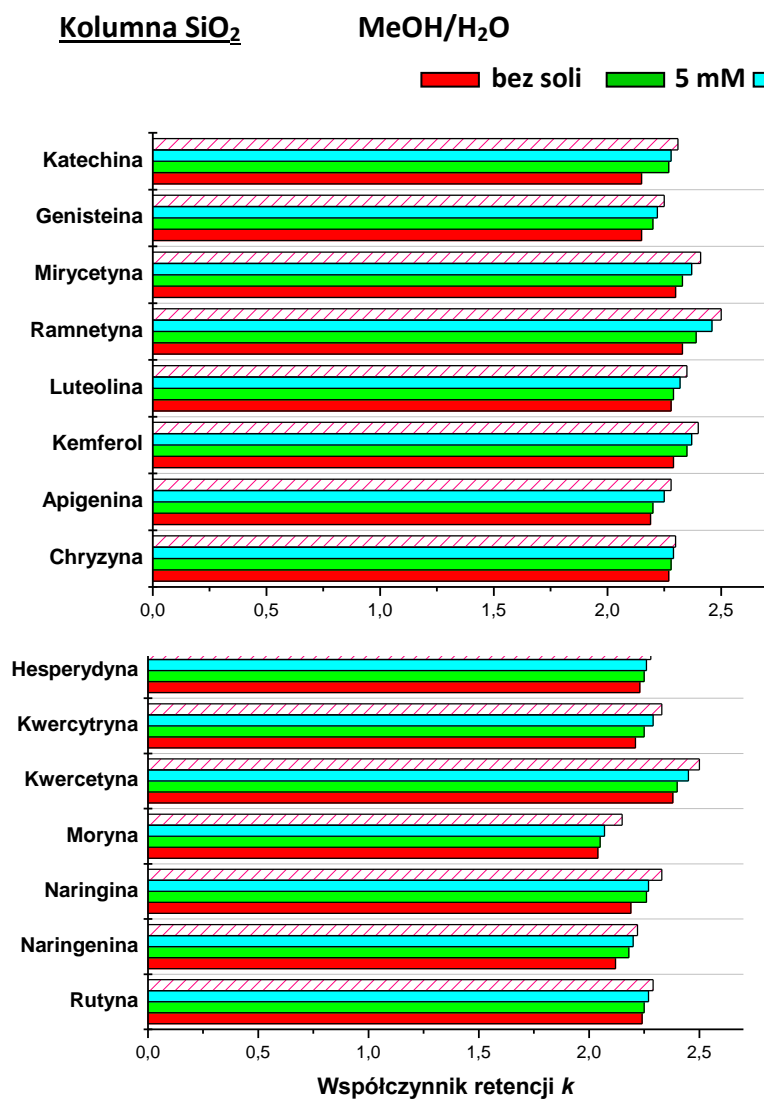


Rys. 31. Zależność współczynników retencji flawonoidów od zawartości metanolu w fazie ruchomej dla kolumny silikażelowej.

6.4.2. Wpływ stężenia soli na retencję flawonoidów

Zbadano wpływ stężenia soli, na przykładzie octanu amonowego, w fazie ruchomej na retencję flawonoidów. Dodatek soli powoduje znaczny wzrost polarności warstwy wodnej, przez co jest ona atrakcyjniejsza dla polarnych analitów. Jednakże taki wpływ zaobserwowano jedynie dla metanolu (rys. 32). Sugeruje to, że głównym mechanizmem retencji jest hydrofilowy podział analitów.

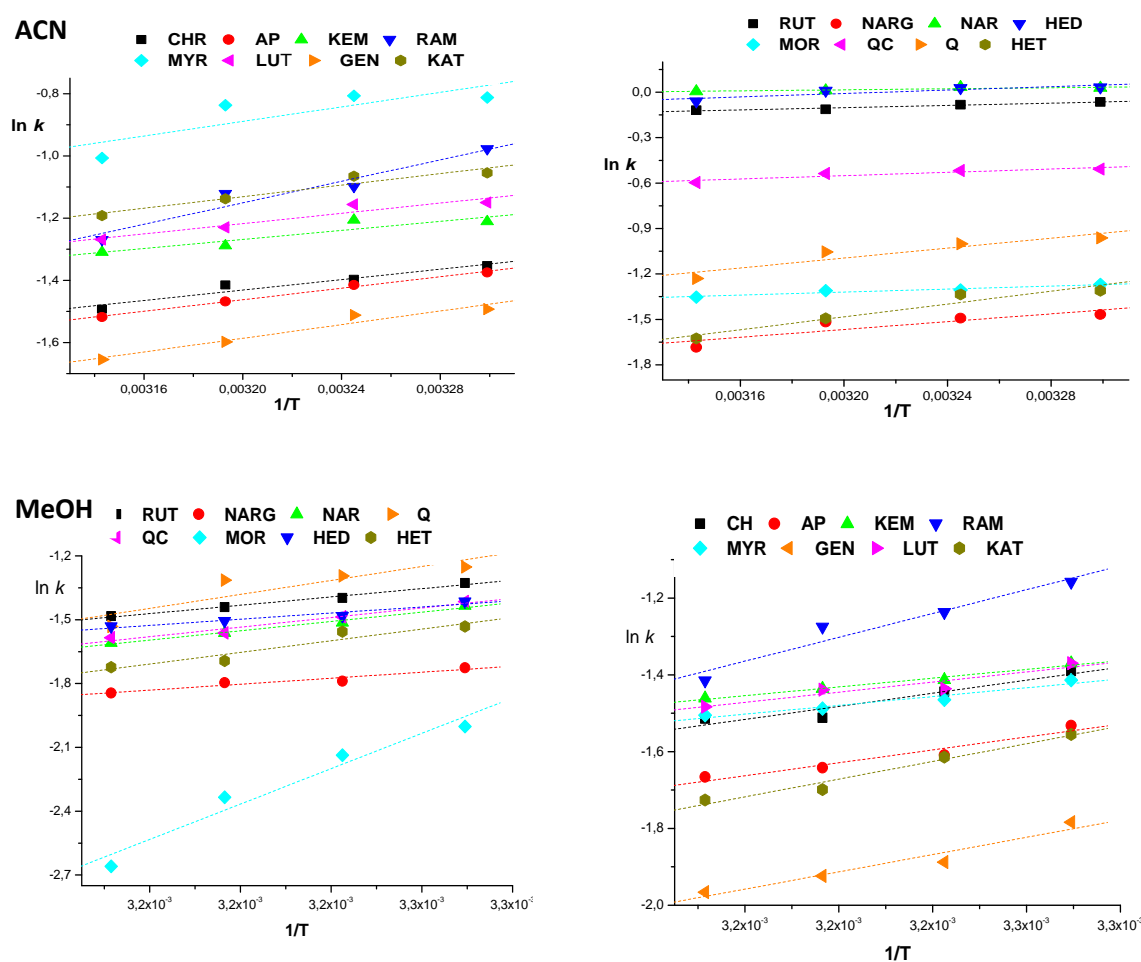
Dla acetonitrylu występuje spadek retencji wraz ze wzrostem stężenia soli w eluencie (rys. 32). Acetonitryl, jako protono-akceptor, ma zdolności do tworzenia wiązań wodorowych, a eluenty zawierające go w składzie tworzą pojedynczą, cienką warstwę wodną, która jedynie w nieznacznym stopniu może ograniczać dostęp analitów do powierzchni złoża a tym samym ich potencjalną adsorpcję [187]. Ze względu na dysocjację grup silanolowych na powierzchni krzemionki, należy założyć, że nie sam hydrofilowy podział będzie dominującym mechanizmem retencji, ale również swój wkład będą mogły mieć oddziaływania elektrostatyczne analitów z tymi grupami. Jeżeli dominującym mechanizmem retencji byłby podział analitu, to wraz ze wzrostem soli, obserwowany byłby wzrost retencji badanych związków. Dodatek soli zwiększa grubość warstwy wodnej i anality mogą w nią głębiej wnikać, co znacznie wydłuża czas potrzebny do ich wymycia z kolumny [61].



Rys.32. Wpływ stężenia octanu amonu na współczynniki retencji flawonoidów dla kolumny silikażelowej.

6.4.3. Wpływ temperatury na retencję flawonoidów

Badania wpływu temperatury kolumny na retencję flawonoidów prowadzono co pięć stopni w zakresie temperatur 20-40 °C. Zgodnie z założeniami chromatografii HILIC, wraz ze wzrostem temperatury retencja związków ulegających hydrofilowemu podziałowi spada, a potwierdzeniem takiego mechanizmu jest prostoliniowy przebieg izoterm van't Hoffa [51,60]. Zbadano tę zależność stosując zarówno acetonitrylu jak i metanol. W obydwu przypadkach otrzymano prostoliniowe zależności (rys. 33), co potwierdza tezę o hydrofilowym podziale analitu jako wiodącym mechanizmie rozdzielania.



Rys. 33. Przebieg izoterm van't Hoffa dla analizowanych związków. Eluent: 95% ACN lub MeOH/woda.

Wszystkie badane flawonoidy charakteryzują się ujemnymi wartościami zmiany entalpii retencji, co sugeruje, że ich rozdzielanie jest procesem egzotermicznym (tabela 14). Wyniki takie uzyskano dla obydwu rozpuszczalników organicznych. Rozdzielanie flawonoidów z zastosowaniem krzemionkowego złoża zależy zatem w dużej mierze od członu entalpowego izotermy van't Hoffa. Wyznaczone zależności termodynamiczne charakteryzowały się dużymi współczynnikami dopasowania powyżej 0,8 dla obydwu stosowanych eluentów (tabela 14).

Tabela 14. Wartości zmiany entalpii rozdzielania na kolumnie Atlantis HILIC.

Nazwa związku	ACN		MeOH	
	ΔH [kJ/mol]	R^2	ΔH [kJ/mol]	R^2
Apigenina	-7.69	0,997	-6,55	0,899
Chryzyna	-6.97	0,964	-6,63	0,873
Genisteina	-9.11	0,973	-8,76	0,907
Hesperydyna	-4.68	0,880	-5,69	0,902
Hesperetyna	-16,0	0,963	-10,7	0,867
Katechina	-7.70	0,963	-8,99	0,957
Kwercetyna	-13.6	0,930	-12,8	0,657
Kwercytryna	-4.54	0,920	-8,81	0,946
Luteolina	-6.86	0,956	-5,45	0,896
Mirycetyna	-9,.71	0,826	-4,46	0,910
Moryna	-3,85	0,963	-32,4	0,934
Naringenina	-10.7	0,882	-5,46	0,889
Naringina	-1.40	0,862	-8,57	0,934
Ramentyna	-14.3	0,967	-12,1	0,906
Rutyna	-3.13	0,975	-7,64	0,979

6.4.4. Parametry analityczne i chromatogramy mieszanin wzorcowych

Ze względu na niewielką retencję flawonoidów na kolumnie krzemionkowej jako optymalny skład eluentu uznano 95% rozpuszczalnika organicznego (ACN lub MeOH) i wodę (czyli najślabszy stosowany eluent). Sporządzono krzywe kalibracji oraz

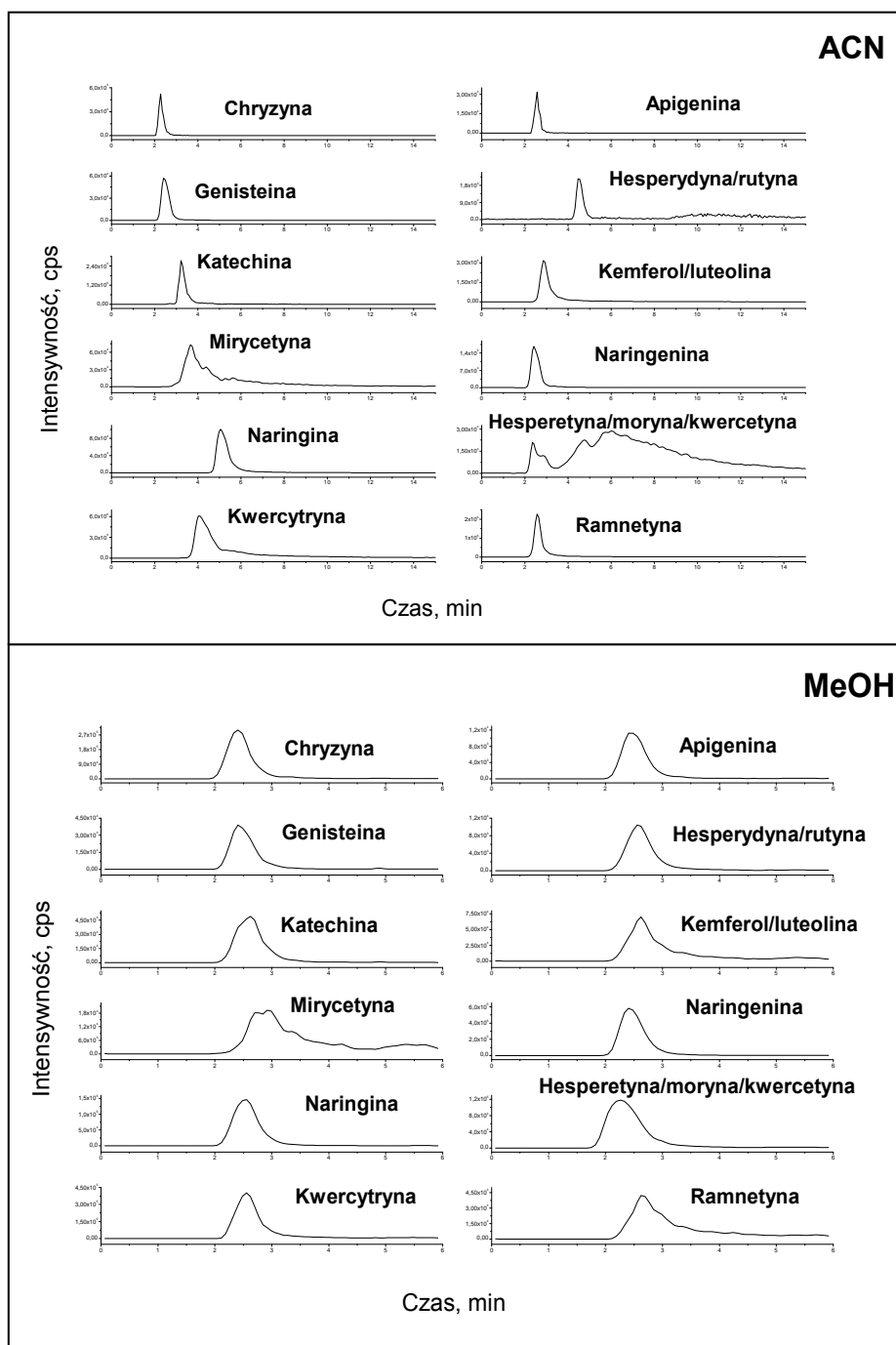
wyznaczono granicę wykrywalności dla analizowanych związków. Uzyskane parametry analityczne zestawiono w tabeli 15.

Tabela 15. Parametry krzywych kalibracyjnych flawonoidów z zastosowaniem kolumny Atlantis HILIC Silica. Faza ruchoma: 95% ACN lub MeOH/woda.

	ACN			MeOH		
	LOD [mg/L]	a	R ²	LOD [mg/L]	a	R ²
Apigenina	0,10	8970	0.997	0,10	74300	0.994
Chryzyna	0,10	632	0.991	0,10	756	0.992
Genisteina	0,10	3100	0.996	0,10	22500	0.986
Hesperetyna	0,25	2360	0.992	0,10	33200	0.998
Moryna	0,10	7860	0.997	0,10	21200	0.998
Naringenina	0,10	14400	0.999	0,10	151000	0.999
Ramnetyna	0,10	4040	0.991	0,10	68400	0.999
Kemferol	0,10	3540	0.999	0,10	28900	0.999
Luteolina	0,10	27700	0.999	0,10	162000	0.999
Kwercetyna	0,25	650	0.998	0,25	2520	0.998
Mirycetyna	0,10	3150	0.990	0,10	9680	0.999
Kwercytryna	0,10	1070	0.994	0,10	7570	0.994
Hesperydyna	0,10	2020	0.999	0,10	7570	0.994
Naringina	0,10	7480	0.997	0,10	14400	0.996
Rutyna	0,25	623	0.995	0,25	775	0.999
Katechina	0,10	1830	0.999	0,10	14000	0.989

a – nachylenie krzywej kalibracyjnej

Większą czułość oznaczeń (na podstawie nachyleń krzywych kalibracji) uzyskano w metanolu. Najwyższe granice wykrywalności (0,25 mg/L) otrzymano dla kwercetyny, rutyny oraz hesperetyny. Zamiana acetonitrylu na metanol, powoduje obniżenie granicy wykrywalności dla hesperetyny do 0,1 mg/L. Jako optymalną metodę rozdzielania uznano tę z zastosowaniem maksymalnej zawartości rozpuszczalnika organicznego w eluencie (95%). Głównym argumentem potwierdzającym słuszność doboru takiego składu eluentu jest niska retencja badanych flawonoidów. Zastosowanie fazy ruchomej o najmniejszej mocy elucyjnej pomaga lekko wydłużyć czasy retencji flawonoidów. Chromatogramy dla mieszaniny związków wzorcowych przedstawiono na rysunku 34, a wyniki sprawności rozdzielania zestawiono w tabeli 16.



Rys. 34. Chromatogramy mieszanin substancji wzorcowych dla kolumny Atlantis HILIC.
Eluent: 95% ACN lub MeOH/woda.

Zaobserwowano różną kolejność elucji w zależności od stosowanego rozpuszczalnika organicznego eluentu:

Faza ruchoma zawierająca 95% ACN/woda:

**HET < NAG < GEN < CHR ~ MOR < AP < KAM < LUT < MYR < RAM < KAT < QC < Q < NA
< HED < RUT**

Faza ruchoma zawierająca 95% MeOH/woda:

**MOR < NAG < KAT ~ GEN < HET < NA < AP < HED < QC < RUT < KAM < MYR < CHR <
LUT < RAM < Q**

Obydwa szeregi elucji odbiegają od uporządkowania analizowanych flawonoidów wraz z ich rosnącą polarnością. Wartości logP dla tych związków wzrastają w szeregu:

**CHR < AP < GEN < RAM < KAM < NAG < LUT < HET < MOR < Q < MYR < QC < NA < RUT
< HED < KAT**

Obserwowane różnice mogą być spowodowane zbyt małą retencją analizowanych flawonoidów na kolumnie krzemionkowej, co powoduje wymycie związków blisko objętości martwej. Różnice w czasach retencji analizowanych związków są niewielkie, jednak można zauważyć, że bardziej zbliżony do szeregu opartego na polarności związków jest ten otrzymany z zastosowaniem ACN jako składnika eluentu. Można zatem założyć, że to właśnie w tych warunkach rozdzielania znaczny wpływ na sumaryczny mechanizm retencji flawonoidów ma podział analitu między warstwę wodną zaadsorbowaną na powierzchni hydrofilowego złoża a niepolarny eluent. W przypadku zastosowania metanolu mechanizm ten wydaje się być bardziej złożony, co jest przyczyną odchylenia szeregu elucji od szeregu opartego na polarności związków.

Tabela 16. Sprawność rozdzielania flawonoidów z zastosowaniem kolumny Atlantis HILIC.

	95% ACN/woda			95% MeOH/woda		
	w _{1/2}	As	N /m	w _{1/2}	As	N /m
Kwercetyna	2,53	4,89	108	0,584	6,59	4463
Apigenina	0,299	1,46	2456	0,307	1,81	19147
Kemferol	0,403	4,58	1426	0,423	3,96	10085
Luteolina	0,254	7,88	3982	0,161	4,19	70217
Ramnetyna	0,307	3,14	2403	0,449	6,72	9339
Mirycetyna	0,658	3,71	1028	0,514	4,17	8835
Genisteina	0,178	2,94	6093	0,340	2,24	15079
Katechina	0,277	2,99	4660	0,510	3,11	7178
Rutyna	0,398	1,43	4325	0,309	4,66	19062
Naringenina	0,220	2,46	3825	0,334	2,57	14421
Naringina	0,349	3,26	6987	0,443	2,40	9117
Moryna	0,420	4,89	1488	0,417	2,40	10557
Kwercytryna	0,831	9,57	786	0,390	3,25	12069
Hesperydyna	0,278	2,05	8826	0,395	2,67	11368
Hesperetyna	0,231	3,69	3295	0,400	3,76	9514
Chryzyna	0,171	2,46	5858	0,356	1,95	15487

w_{1/2}- szerokość pików w połowie wysokości [min], N – liczba pól teoretycznych,

As – współczynnik asymetryczności pików

Większą sprawność rozdzielania uzyskano stosując metanol, co przekłada się na większą liczbę pól teoretycznych na metr kolumny. Jednakże współczynniki asymetryczności (As) pokazują, że wpływ rodzaju stosowanego rozpuszczalnika organicznego na kształt sygnału zależy od konkretnego związku. Nie stwierdzono wyraźnego trendu między wartościami współczynników asymetryczności oraz szerokościami pików w połowie wysokości, a rodzajem stosowanego rozpuszczalnika organicznego w eluencie.

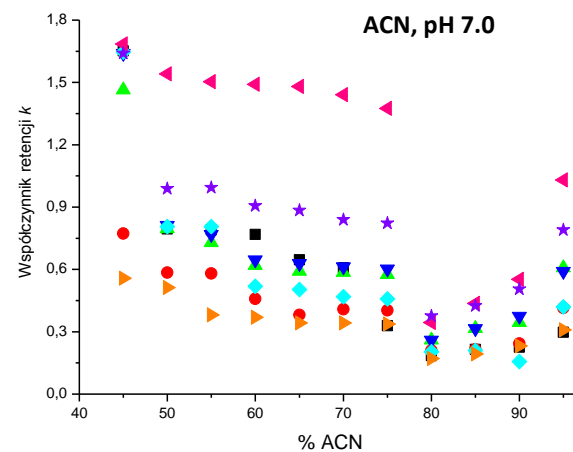
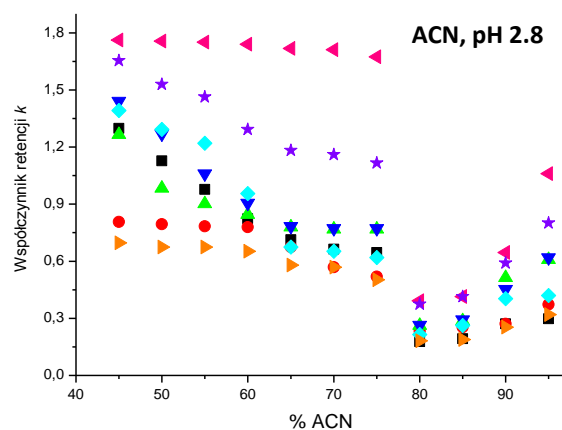
6.5. Kolumna Luna HILIC

6.5.1. Wpływ pH i zawartości rozpuszczalnika organicznego w fazie ruchomej na retencję flawonoidów

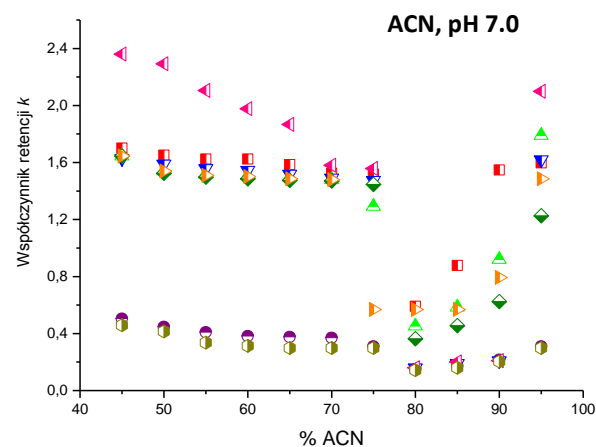
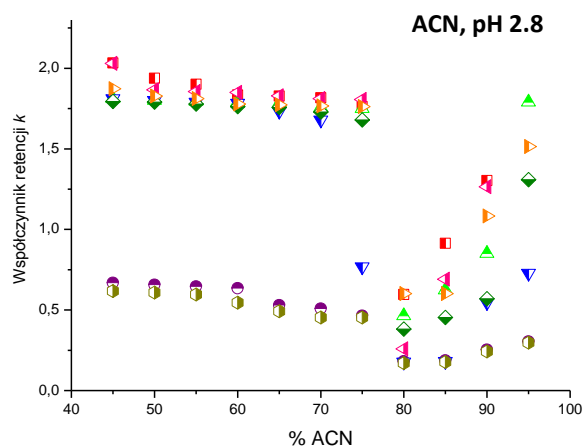
Według zaleceń producenta, kolumna diolowa jest przystosowana do pracy w zakresie pH 2-7,5. Zbadano wpływ pH składnika wodnego fazy ruchomej na sprawność rozdzielania flawonoidów wykorzystując komponent wodny eluentu o pH 2,8 oraz 7. Podobnie jak w rozdziale 6.4.1., jeśli hydrofilowy podział miał być głównym mechanizmem rozdzielania na kolumnie diolowej, wraz ze wzrostem pH fazy ruchomej, powinno się obserwować wzrost retencji flawonoidów. W wyższym pH flawonoidy są już zdysocjowane (zależnie od ich wartości pKa), a przez co bardziej polarne. Wykształcona na powierzchni fazy stacjonarna warstwa wodna powinna zatem być dla nich bardziej atrakcyjna, skutkiem czego ich czas retencji powinien ulec wydłużeniu. Uzyskane wyniki potwierdziły wysuniętą hipotezę. Wraz ze wzrostem pH eluentu, następuje niewielkie wydłużenie czasów retencji dla wszystkich analizowanych związków (rys. 35-36). Jednak zgodnie z charakterystyką złożeń neutralnych (do których zaliczane jest złoże diolowe), obserwowana retencja nie powinna być zależna od pH [31].

Zbadano także wpływ zależności zawartości rozpuszczalnika organicznego na wartości współczynników retencji badanych związków. W przypadku acetonitrylu, podobnie jak dla toluenu, uzyskane krzywe miały kształt litery U (rys. 35-36). Minimalna retencja przypada na 80% zawartości acetonitrylu w fazie ruchomej. Zależność tego typu została uzyskana przy dwóch badanych wartościach pH (2,8 oraz 7). Uzyskany przebieg krzywych pozwala sądzić, że w eluentach o dużych zawartościach rozpuszczalników organicznych (z punktu widzenia teorii HILIC, kluczowych), dominującym mechanizmem retencji będzie hydrofilowy podział. Podwójny mechanizm retencji nie jest już tak wyraźny jak w przypadku zamiany acetonitrylu metanolem.

■ chryzyna ● apigenina ▲ kaemferol ▼ luteolina ◆ ramnetyna ▲ mirycetyna ▼ genisteina ★ katechina

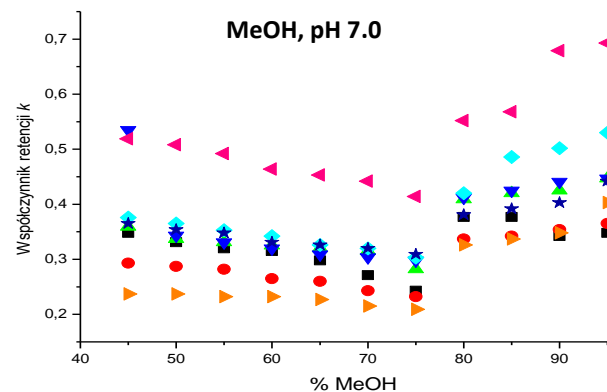
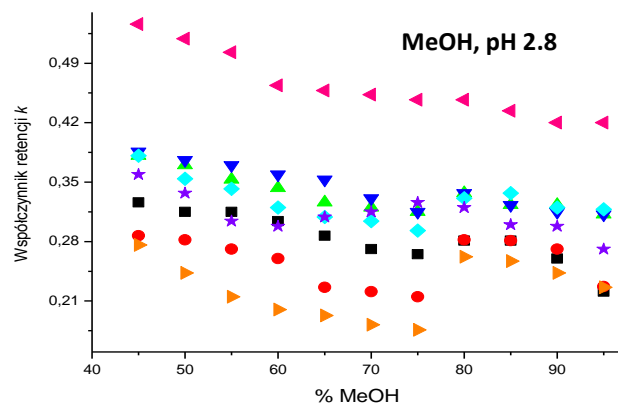


■ rutyna ● naringenina ▲ naringina ▼ moryna ◆ kwercetyna ▲ kwercetyna ▼ hesperydyna ● hesperetyna

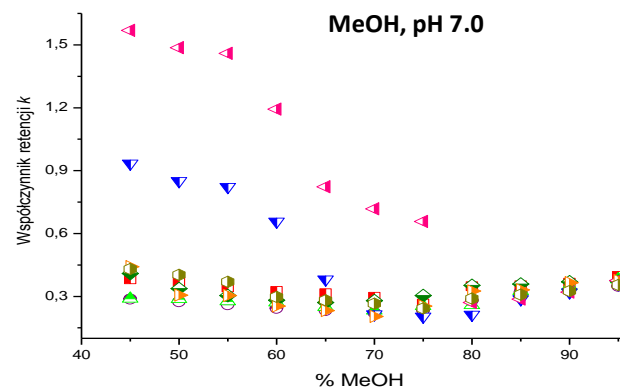
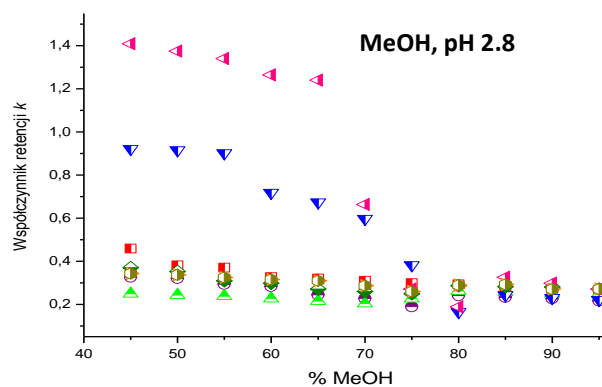


Rys. 35. Zależność współczynników retencji flawonoidów od zawartości acetonitrylu w fazie ruchomej dla kolumny diolowej.

■ chryzyna ● apigenina ▲ kaemferol ▼ luteolina ◆ ramnetyna ▲ mirycetyna ► genisteina ☆ katechina



■ rutyna ● naringenina ▲ naringina ▼ moryna ◆ kwercetryna ▲ kwercetyna ► hesperydyna ● hesperetyna



Rys. 36. Zależność współczynników retencji flawonoidów od zawartości metanolu w fazie ruchomej dla kolumny diolowej.

Tylko dla niektórych związków obserwowany jest kształt litery U. Może to być spowodowane zbyt dużym podobieństwem metanolu do wody, a także jego zaburzaniem wytworzonej warstwy wodnej. Metanol zastępując cząsteczki wody w warstwie, znacznie zmniejsza jej polarność. Wobec tego cała teoria podziału między niepolarny eluent a polarną warstwę wodną zostaje zachwiana.

6.5.2. Wpływ stężenia soli na retencję flawonoidów

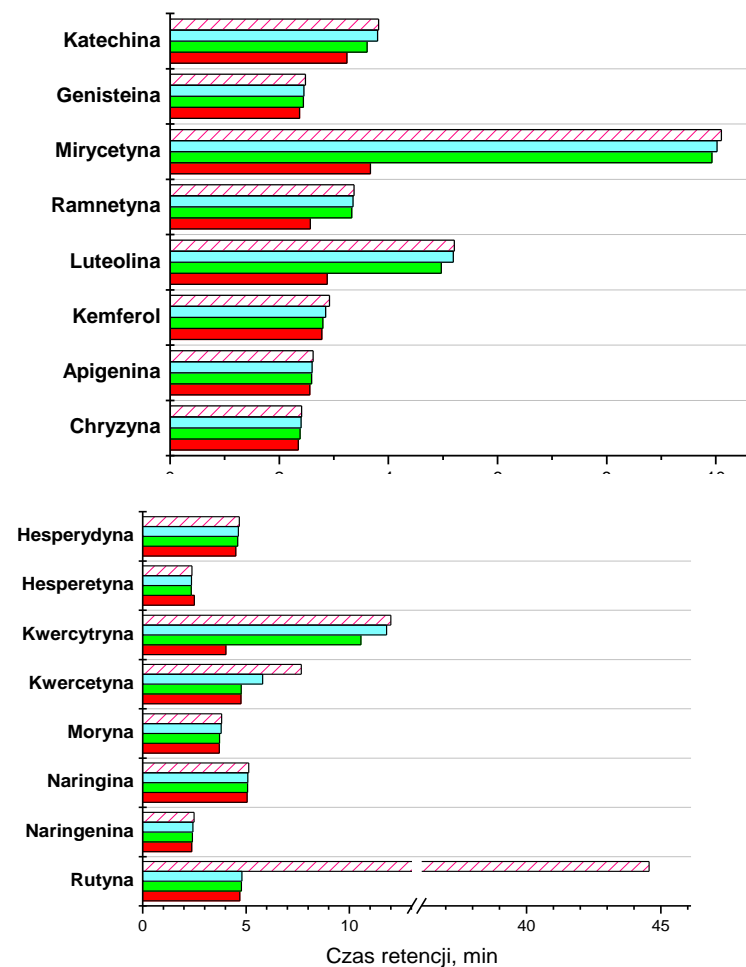
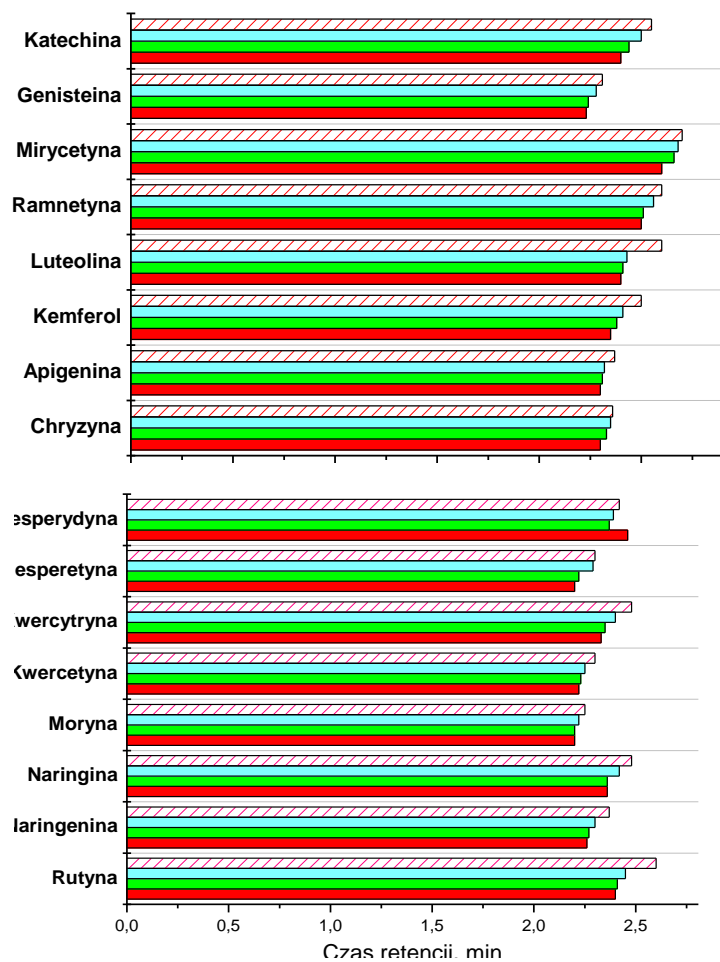
Zbadano wpływ obecności soli w fazie ruchomej na retencję flawonoidów z zastosowaniem diolowej fazy stacjonarnej. Wraz ze wzrostem stężenia octanu amonu w eluencie, zaobserwowano wzrost retencji flawonoidów, zarówno z wykorzystaniem acetonitrylu jak i metanolu (rys. 37). Z rosnącym stężeniem soli, rośnie także polarność warstwy wodnej. Sytuacja taka sprzyja hydrofilowemu podziałowi, a retencja powinna być ściśle powiązana z polarnością analitu. Jest to przesłanka aby sądzić, że mechanizm rozdzielania na kolumnie diolowej zachodzi według mechanizmu podziałowego.

Kolumna DIOL:

MeOH/H₂O

ACN/H₂O

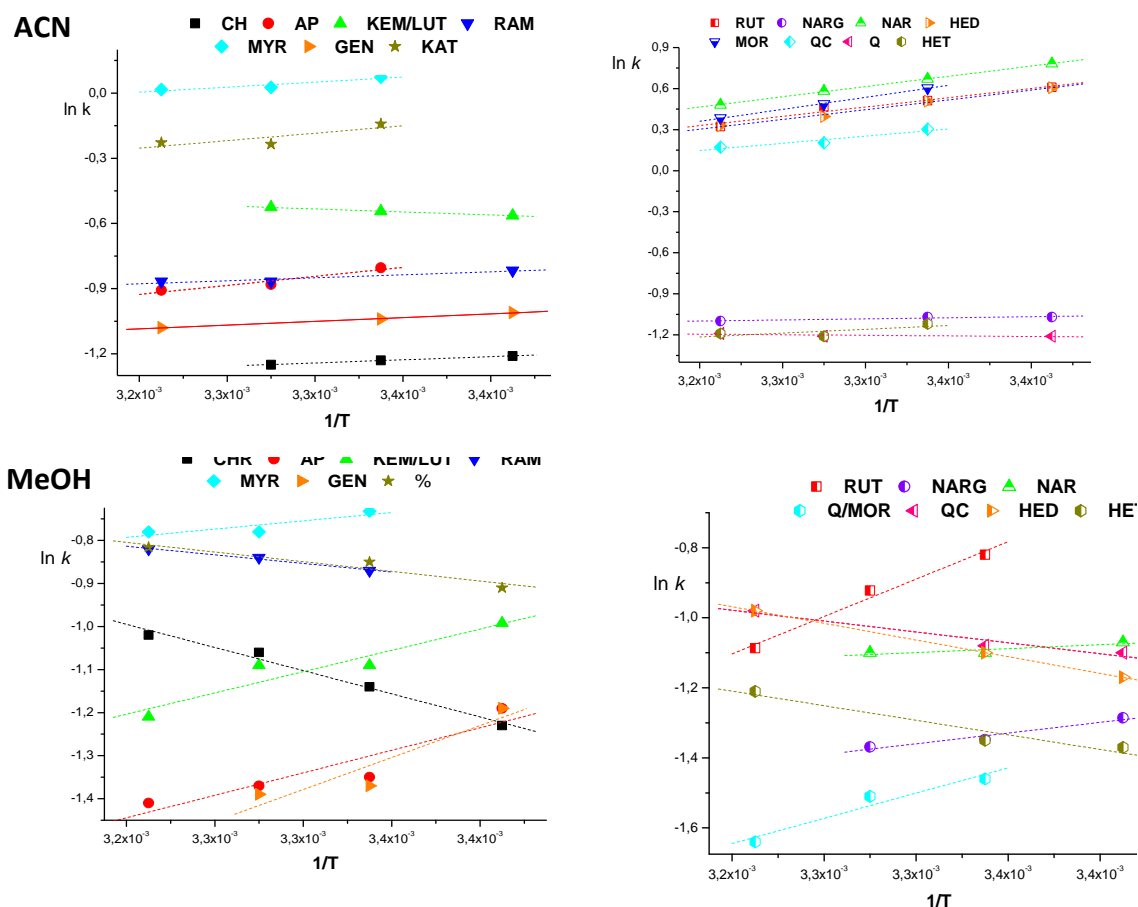
bez soli 5 mM 10 mM 15 mM CH₃COONH₄



Rys 37. Wpływ stężenia octanu amonu na czasy retencji flawonoidów na kolumnie diolowej.

6.4.3. Wpływ temperatury na retencję flawonoidów

Zbadano wpływ temperatury na retencję flawonoidów, pracując w zakresie temperatur 20-40 °C. Badania wykonano z użyciem zarówno acetonitrylu jak i metanolu (Rys. 38). Stosowana faza ruchoma zawierała 95% rozpuszczalnika organicznego.



Rys 38. Przebieg izoterm van't Hoffa dla kolumny diolowej. Eluent: 95% ACN lub MeOH/woda.

Otrzymane zależności ze względu na ich prostoliniowy przebieg, potwierdzają przypuszczenia, że dominującym mechanizmem retencji flawonoidów na złożu diolowym jest hydrofilowy podział analitu. Wyznaczono także zmianę entalpii procesu rozdzielania dla

wszystkich analizowanych związków. W przypadku acetonitrylu prawie dla wszystkich związków wartości entalpii są ujemne (z wyjątkiem kemferolu i luteoliny). Sugeruje to, że ich rozdzielanie jest procesem egzotermicznym. Zastosowanie metanolu zamiast acetonitrylu jako składnika fazy ruchomej powoduje zróżnicowanie, wartości entalpii co do jej znaku (Tabela 17).

Tabela 17. Wartości zmiany entalpii rozdzielania na kolumnie Luna HILIC.

Nazwa Związku	ACN		MeOH	
	ΔH [kJ/mol]	R^2	ΔH [kJ/mol]	R^2
Chryzyna	-2,94	0,999	10,7	0,969
Apigenina	-7,97	0,877	-10,3	0,752
Kemferol/ Luteolina	2,80	0,999	-9,79	0,836
Kwercetyna	-16,4	0,983		
Ramentyna	-2,74	0,805	3,68	0,976
Mirycetyna	-4,68	0,801	-3,54	0,509
Genisteina	-3,45	0,981	-14,8	0,656
Katechina	-6,63	0,408	4,43	0,781
Rutyna	-13,5	0,930	-20,3	0,956
Naringenina	-1,61	0,772	-6,12	0,855
Naringina	-14,9	0,997	-2,21	0,509
Kwercytryna	-10,0	0,856	6,22	0,930
Hesperydyna	-14,2	0,991	8,83	0,756
Hesperetyna	-5,41	0,928	8,37	0,896
Moryna	-16,72	0,999	-	-
Kwercetyna/Moryna	-	-	-13,67	0,861

Rozdzielenie kwercetyny i moryny jest możliwe jedynie stosując ACN jako składnik fazy ruchomej. Jeżeli użyty zostanie MeOH następuje koelucja tych związków.

6.5.4. Parametry analityczne i chromatogramy mieszanin wzorcowych

Również w przypadku kolumny diolowej sporządzono krzywe kalibracji oraz wyznaczono granicę wykrywalności dla analizowanych związków, wykorzystując fazę ruchomą zawierającą 95% rozpuszczalnika organicznego (ACN lub MeOH) i wodę. Wyniki prezentuje tabela 18.

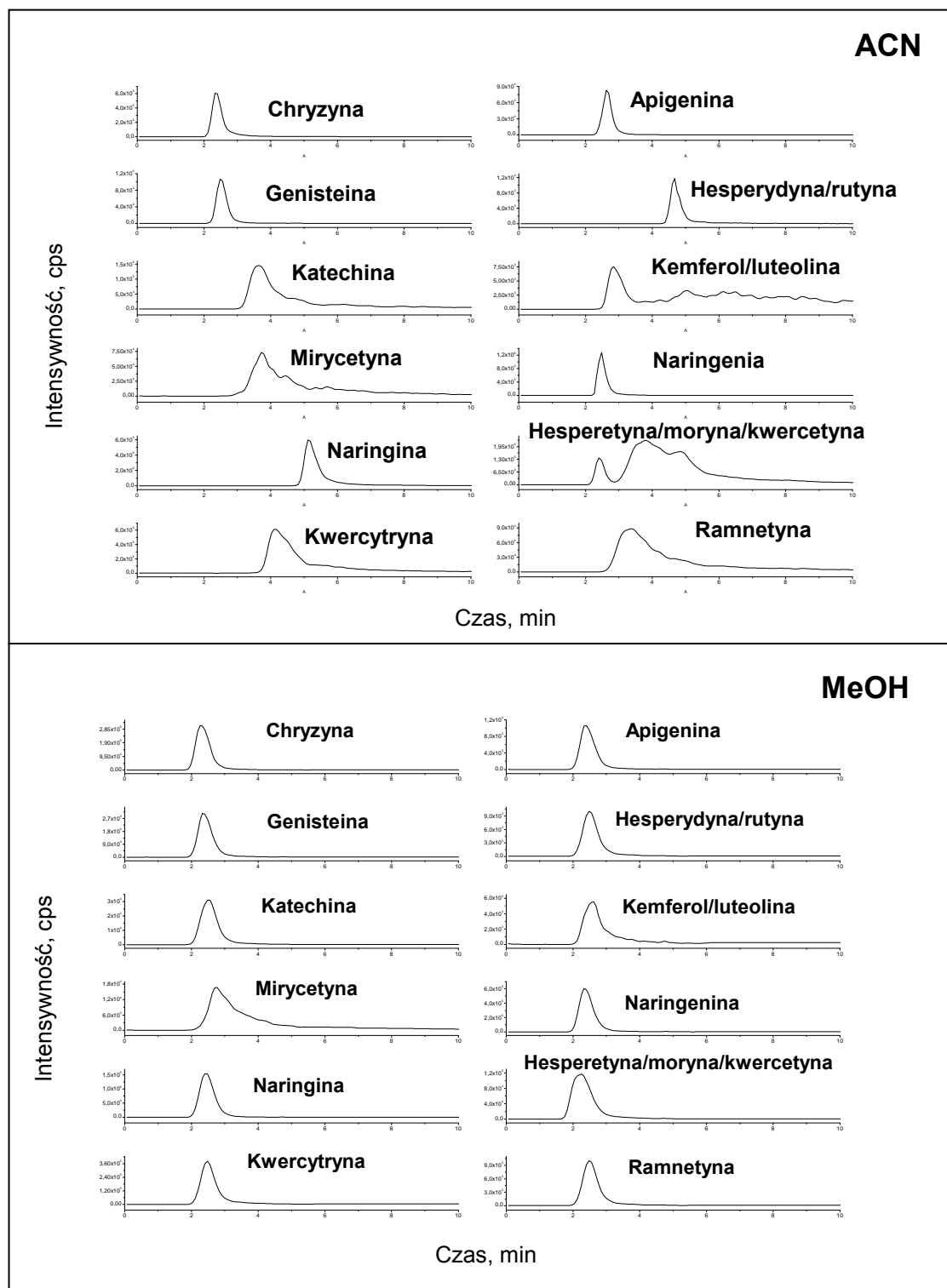
Tabela 18. Parametry kalibracji flawonoidów z zastosowaniem kolumny Luna HILIC. Faza ruchoma: 95% ACN lub MeOH/woda.

	ACN			MeOH		
	LOD [mg/l]	a	R ²	LOD [mg/l]	a	R ²
Chryzyna	0,01	25200	0.993	0,01	367000	0.985
Hesperetyna	0,02	77900	0.995	0,01	319000	0.992
Moryna	0,10	591000	0.996	0,05	18300	0.997
Genisteina	0,01	21400	0.997	0,01	97400	0.997
Naringenina	0,01	88000	0.999	0,01	264000	0.999
Apigenina	0,01	66100	0.947	0,01	171000	0.995
Ramnetyna	0,02	126000	0.998	0,01	175000	0.998
Kemferol	0,01	27500	0.994	0,02	14900	0.995
Luteolina	0,01	143000	0.997	0,01	523000	0.999
Kwercetyna	0,10	119000	0.995	0,10	18200	0.999
Mirycetyna	0,10	47300	0.998	0,10	43000	0.999
Kwercytryna	0,05	632000	0.998	0,02	174000	0.999
Hesperydyna	0,10	3500	0.997	0,10	1520	0.995
Naringina	0,05	234000	0.996	0,05	52300	0.999
Rutyna	0,10	488	0.999	0,10	1730	0.999
Katechina	0,01	37700	0.986	0,01	44800	0.999

a -nachylenie krzywej kalibracji

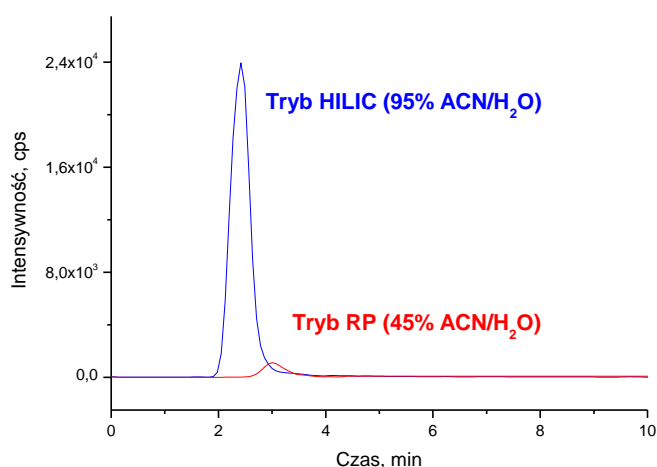
Dla większości analitów większą czułość (na podstawie nachylenia krzywych) otrzymano stosując metanol, ale nie jest to regułą. Uzyskane sygnały cechują się zbliżonymi wartościami czasów retencji i gdyby nie detekcja z zastosowaniem spektrometrii mas, nie byłaby możliwa ich identyfikacja. Ze względu na krótkie czasy retencji flawonoidów na

kolumnie diolowej, jako optymalne metody uznano te, opierające się o elucję izokratyczną z maksymalną zawartością rozpuszczalnika organicznego w fazie ruchomej (95% ACN bądź MeOH/ woda). Uzyskane chromatogramy przedstawiono na rysunku 39.



Rys. 39. Chromatogramy substancji wzorcowych. Eluent: 95% ACN lub MeOH/woda.

Biorąc pod uwagę fakt, że kolumna diolowa może być stosowana zarówno w trybie HILIC jak i RP, porównano czułości oznaczeń, wykorzystując zarówno eluent o dużej zawartości rozpuszczalnika organicznego (95% - tryb HILIC), jak i o małej jego ilości (tryb RP). Badania pokazały, że w każdym przypadku wyższą czułość uzyskuje się pracując w trybie HILIC. Przyczynia się do tego duża zawartość rozpuszczalnika organicznego w eluencie co sprzyja większej efektywności jonizacji w źródle jonów spektrometru mas (Rys. 40).



Rys. 40. Porównanie czułości detekcji w trybie HILIC i RP na przykładzie apigeniny.

Porównano także selektywności rozdzielania z zastosowaniem acetonitrylu oraz metanolu, jako składnika fazy ruchomej. Sprawność rozdzielania w przeliczeniu na liczbę póltek teoretycznych na metr kolumny zależy od analitu i nie można jednoznacznie stwierdzić, który z zastosowanych rozpuszczalników organicznych, pozwala uzyskać wyższą wartość N (Tabela 19).

Tabela 19. Sprawność rozdzielania flawnoidów na kolumnie Luna HILIC.

	95% ACN/woda			95% MeOH/woda		
	w _{1/2}	As	N /m	w _{1/2}	As	N /m
Kwercetyna	2,53	5,58	180	0,584	1,53	740
Apigenina	0,299	1,35	4090	0,307	2,00	3190
Kemferol	0,403	1,04	2370	0,423	1,54	1680
Luteolina	0,254	3,76	6630	0,161	1,62	11700
Ramnetyna	0,307	1,52	4000	0,449	0,428	1560
Mirycetyna	0,658	2,67	1710	0,514	3,29	1470
Genisteina	0,178	2,41	10160	0,340	1,65	2510
Katechina	0,277	4,87	7770	0,510	1,71	1200
Rutyna	0,398	1,96	7210	0,309	0,568	3180
Naringenina	0,220	1,65	6380	0,334	1,82	2400
Naringina	0,349	1,73	11650	0,443	2,20	1520
Moryna	0,420	2,86	2480	0,417	1,45	1760
Kwercytryna	0,831	0,568	1310	0,39	1,56	2010
Hesperydyna	0,278	0,414	14710	0,395	1,38	1890
Hesperetyna	0,231	2,39	5490	0,400	2,04	1590
Chryzyna	0,171	1,02	9760	0,356	1,32	2580

szerość piku w połowie wysokości [min], N – liczba pól teoretycznych,
As – współczynnik asymetryczności piku.

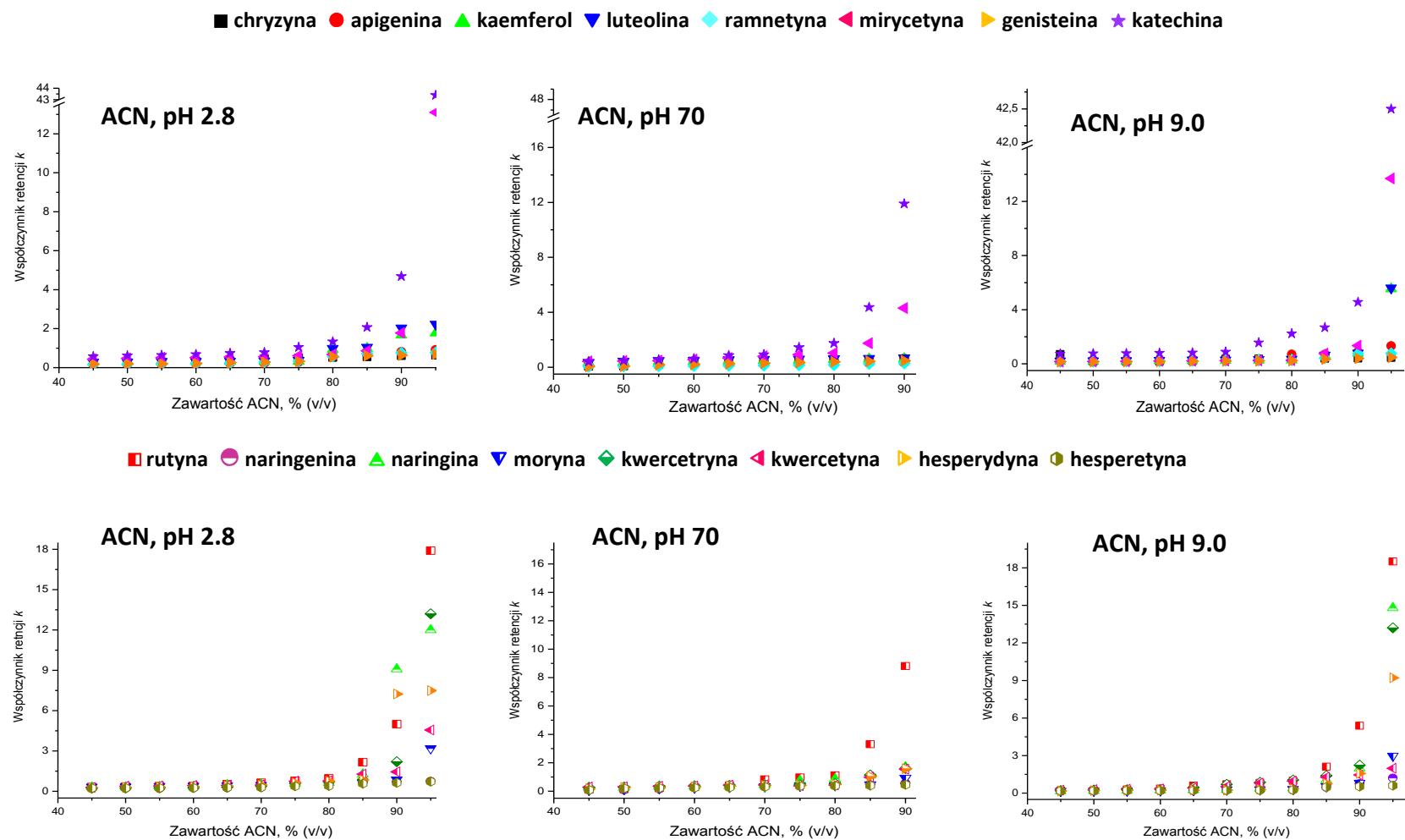
6.6. Kolumna ZIC- pHILIC

6.6.1. Wpływ pH i zawartości rozpuszczalnika organicznego w fazie ruchomej na retencję flawonoidów

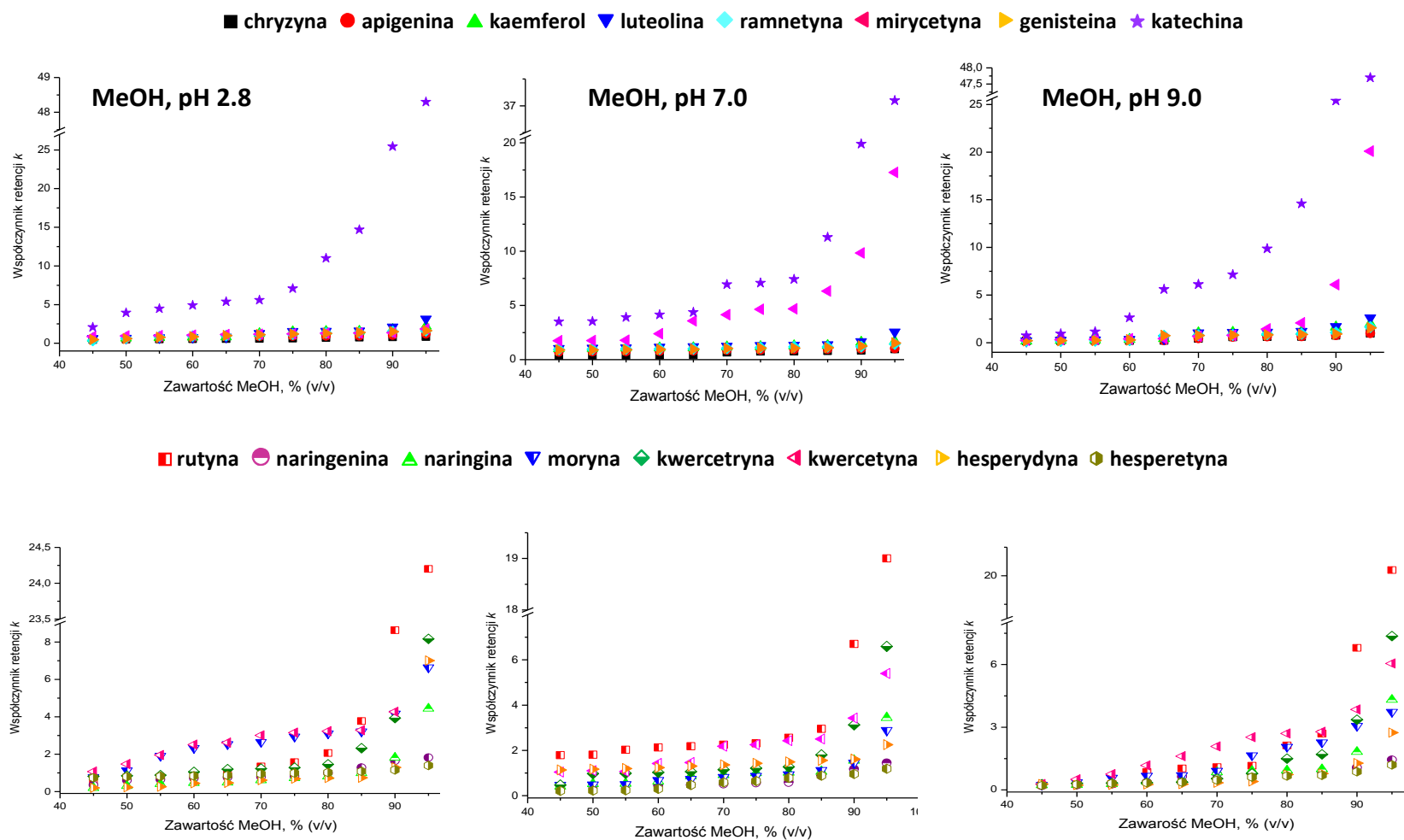
Zastosowanie kolumny polimerycznej umożliwiło zbadanie retencji flawonoidów w trzech wartościach pH: 2,8, 7 oraz 9. Ponad to polimeryczna matryca złoza umożliwiła wyeliminowanie wpływu grup silanolowych na retencję flawonoidów. W środowisku kwaśnym flawonoidy powinny wykazywać najmniejszą retencję ze względu na swoją umiarkowaną polarność. Wraz ze wzrostem pH ich retencja powinna ulegać wydłużeniu, co wiąże się ze wzrostem ich polarności na skutek dysocjacji (stałe dysocjacji flawonoidów są w zakresie 7-11). Wyniki badań eksperymentalnych dowodzą natomiast, że brak jest wyraźnego wpływu pH na retencję flawonoidów z zastosowaniem sulfobetainowej fazy stacjonarnej o polimerycznym podłożu (rys. 41-42). W budowie tego złoza czwartorzędowa grupa aminowa znajduje się bliżej matrycy modyfikacji. Bardziej dostępna jest zatem ujemnie naładowana grupa sulfonowa i to z nią anality mają ułatwiony kontakt. Można zatem przyjąć, że powierzchnia kontaktu złoza z analitem ma wypadkowy, ujemny ładunek, niezależny od warunków prowadzenia analizy. Dlatego też nie obserwuje się wpływu pH na retencję flawonoidów z zastosowaniem tej fazy stacjonarnej. Jest to jedna z cech charakterystycznych dla złożeń dwubiegunowych.

Wyniki wpływu zawartości rozpuszczalników organicznych na retencję flawonoidów z zastosowaniem fazy *p*ZIC-HILIC przedstawiono na rysunkach 41-42. Dla obu rozpuszczalników organicznych wraz ze wzrostem zawartości rozpuszczalnika organicznego w eluencie zaobserwowano wzrost wartości współczynników retencji (Rys. 41-42). Jednakże zastąpienie acetonitrylu metanolem powoduje zwiększenie współczynników retencji niektórych flawonoidów (wyjątek katechina). Metanol ma zdolność do tworzenia wiązań wodorowych jako donor protonów, podczas gdy acetonitryl oddziałuje z fazą stacjonarną poprzez oddziaływania wodorowe jako akceptor protonów. Powoduje to, że alkohol może tworzyć wielokrotne warstwy na powierzchni fazy stacjonarnej, podczas gdy acetonitryl tylko jedną [179]. Anality, ulegając hydrofilowemu podziałowi w eluencie zawierającym metanol, wnikają głębiej w powierzchnię warstwy niż ma to miejsce w przypadku acetonitrylu. Fakt

ten znacznie wydłuża czas potrzebny do wymycia badanych związków z kolumny. Hipotezę tę może potwierdzać sama charakterystyka kolumn posiadających sulfobetainowe złoże, która mówi, że mają one duże zdolności do adsorpcji wody na powierzchni i są podatne na tworzenie hydrofilowej warstwy wodnej. Dane literaturowe wskazują [4], że wielokrotne warstwy wodne tworzą się, gdy w fazie ruchomej jest mniej niż 20% wody i to właśnie w tym zakresie zaobserwowano znacząco wyższe współczynniki retencji dla metanolu. Z drugiej strony jednak, dla niektórych związków nastąpiło skrócenie czasów retencji gdy zastosowano metanol.



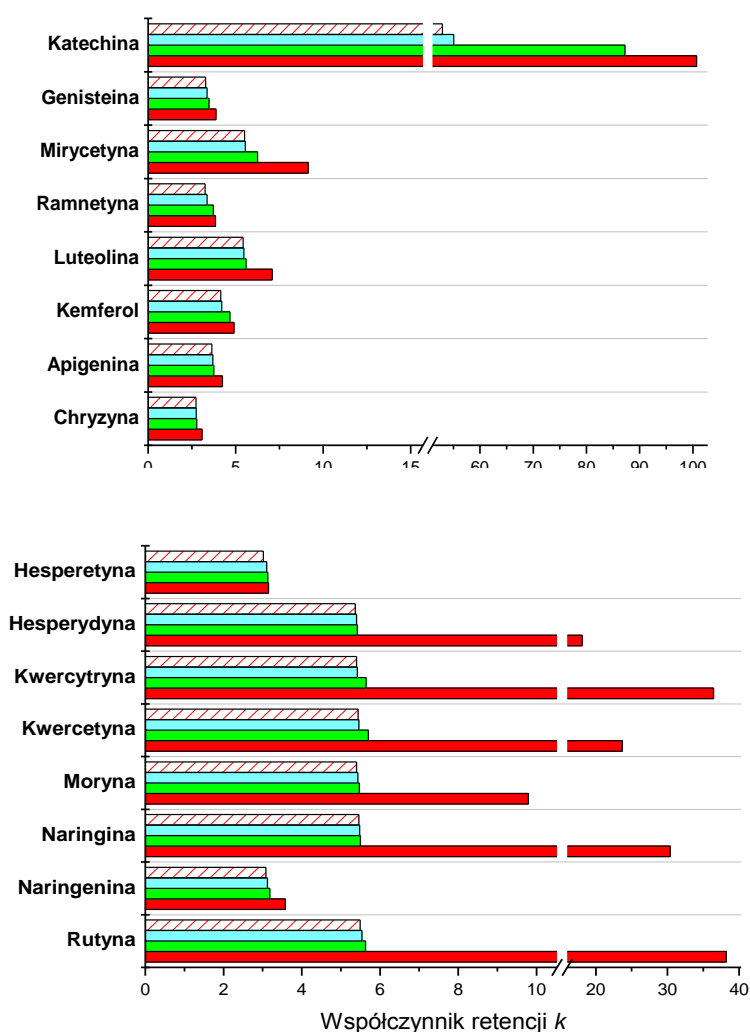
Rys. 41. Zależność współczynników retencji flawonoidów od zawartości acetonitrylu w fazie ruchomej dla kolumny *p*ZIC-HILIC.



Rys. 42. Zależność współczynników retencji flawonoidów od zawartości metanolu w fazie ruchomej dla kolumny *p*ZIC-HILIC.

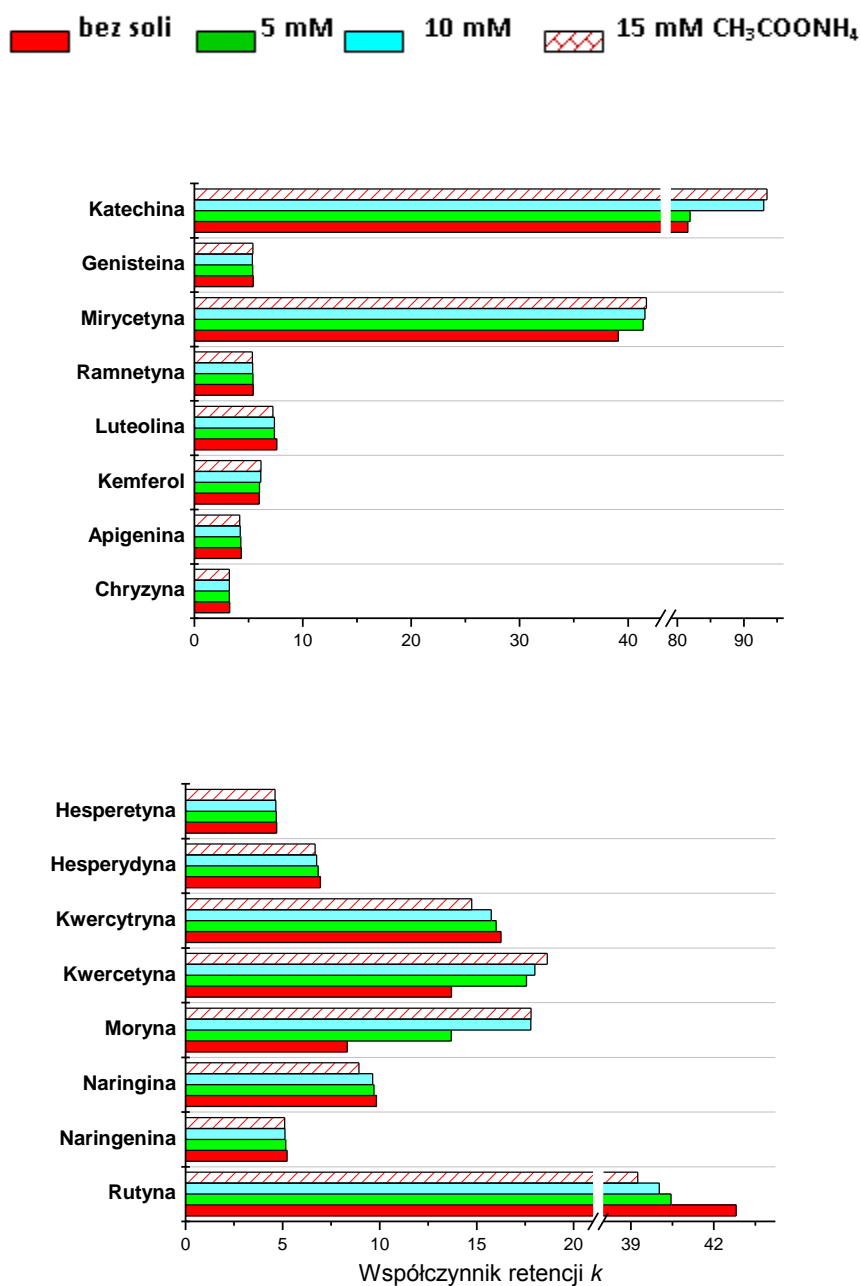
6.6.2. Wpływ stężenia soli na retencję flawonoidów

Zbadano wpływ stężenia octanu amonu w eluencie na retencję flawonoidów. Stosowano wodny roztwór octanu amonu o stężeniach 5, 10 oraz 15 mmol/L. Wyniki uzyskane dla acetonitrylu jako składnika organicznego fazy ruchomej przedstawia rysunek 43.



Rys. 43. Wpływ stężenia octanu amonu na współczynniki retencji flawonoidów dla kolumny *p*ZIC-HILIC. Faza ruchoma: 95% ACN/ woda lub octan amonu.

W przypadku zastosowania acetonitrylu jako składnika fazy ruchomej, retencja flawonoidów maleje wraz ze wzrostem stężenia soli w eluencie. Najdłuższe czasy retencji otrzymuje się, gdy woda jest składnikiem eluentu. Obecność soli w eluencie wpływa na polarność i moc jonową warstwy wodnej. Skrócenie czasów retencji wraz ze wzrostem stężenia soli sugeruje, że głównym mechanizmem retencji jest wymiana jonowa i oddziaływania elektrostatyczne. W sytuacji braku soli w eluencie (braku jonów, innych niż analit o tym samym ładunku) tylko analit oddziałuje elektrostatycznie z naładowanymi grupami fazy stacjonarnej. W momencie pojawienia się przeciwnonu następuje wypieranie analitu z fazy stacjonarnej przez jony pochodzące z soli, co skutkuje skróceniem jego retencji. Wpływ ten jest szczególnie widoczny dla analitów o dużych wartościach współczynników retencji, np. katechiny, rutyny, kwercytryny, kwercetyny. Zastosowanie do ich analizy roztworu octanu amonu zamiast wody, pozwala znacznie skrócić czas pojedynczej analizy. Skrócenie czasów retencji związków wraz ze wzrostem buforu organicznego wyklucza mechanizm podziałowy jako odpowiedzialny za ich rozdzielenie. Związki ulegające temu mechanizmowi powinny wykazywać większą retencję w obecności soli w fazie ruchomej (wzrost polarności warstwy wodnej). Ponadto dodatek soli zwiększa grubość warstwy wodnej [61]. Jeżeli tak, to faza stacjonarna jest dla analitów trudniej dostępna a oddziaływania z nią bardziej ograniczone. Zatem dla związków ulegających adsorpcji na złożu lub oddziałujących elektrostatycznie ze złożem, dodatek buforu nieorganicznego powoduje skrócenie retencji. Zupełnie inaczej wpływa wzrost stężenia soli w eluencie, gdy zastosowano metanol zamiast acetonitrylu; brak jest jednej wyraźnej tendencji w zmianie retencji wszystkich flawonoidów (Rys. 44). Dla katechiny, kwercetyny i mirycetyny zauważono wydłużenie czasów retencji wraz ze wzrostem stężenia octanu amonu, co występuje dla związków, które ulegają hydrofilowemu podziałowi. W wyniku dodatku soli zwiększa się polarność warstwy wodnej, przez co jest ona jeszcze bardziej atrakcyjna dla polarnych eluentów. Ponadto, dodatek soli zwiększa grubość warstwy wodnej. Anality mogą zatem wnikać w nią głębiej, co powinno wydłużać czas, potrzebny do ich elucji z kolumny. Dla innych badanych związków, np. rutyny, hesperydyny, naringiny oraz kwercytryny, zauważono skrócenie czasów retencji wraz ze wzrastającym stężeniem soli. Metanol może zastępować cząsteczki wody w hydrofilowej warstwie, zmniejszając jej polarność. Konsekwencją może być niska retencja najbardziej polarnych związków.



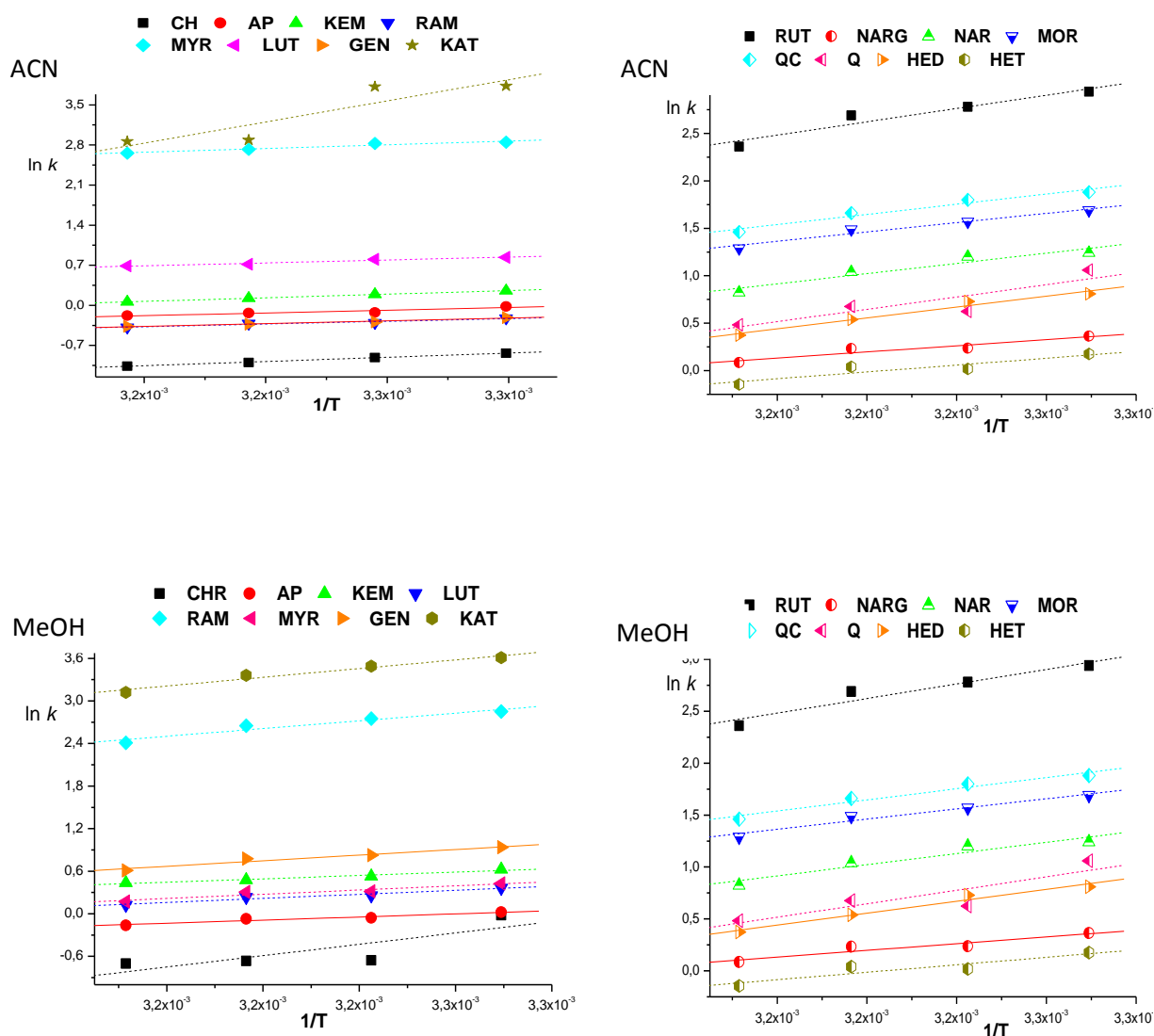
Rys. 44. Wpływ stężenia soli na współczynniki retencji flawonoidów dla kolumny *p*ZIC-HILIC. Faza ruchoma: 95% MeOH/ woda lub CH₃COONH₄.

Gdy za retencję związków odpowiedzialny jest także mechanizm wymiany jonowej, również obserwuje się spadek wartości współczynników retencji [45]. Współzawodnictwo jonów zdysocjowanej soli i analitów o miejsce oddziaływania, powoduje skrócenie czasów

retencji rozdzielanych związków. W obecności soli, możliwa jest sytuacja, w której mimo, iż analit „odpycha się” z grupą pochodzącą z fazy stacjonarnej (mającą ten sam znak), to i tak wykazuje on retencję na złożu na skutek oddziaływań z jonami warstwy wodnej (mechanizm ERLIC) i retencja takich analitów jest wypadkową tych dwóch oddziaływań elektrostatycznych. Dla pozostałych analizowanych związków wykazano bardzo niewielki wpływ stężenia soli w eluencie na wartości współczynników retencji. Z jednej strony mogą być one zbyt słabo zatrzymywane, aby wpływ ten był widoczny. Z drugiej strony jednak, można przypuszczać, że mechanizm ich retencji jest na tyle złożony, że sama zmiana stężenia soli w eluencie i związane z tym oddziaływania są niewielkim wkładem do całkowitego mechanizmu retencji. Wyraźnie jednak widać, że w przypadku zastosowania metanolu jako składnika fazy ruchomej, mechanizm retencji wydaje się być bardziej skomplikowany i różnorodny niż w przypadku acetonitrylu.

6.6.3. Wpływ temperatury na retencję flawonoidów

Badania prowadzono co pięć stopni w zakresie temperatur 20-40 °C, nie przekraczając maksymalnej temperatury sugerowanej przez producenta. Zgodnie z teorią wzrost temperatury rozdzielania powinien skutkować obniżeniem wartości czasu retencji, jeżeli głównym mechanizmem rozdzielania jest hydrofilowy podział analitu. Niezależnie od tego, czy jako głównego składnika fazy ruchomej użyto metanolu czy acetonitrylu wraz ze wzrostem temperatury czasy retencji wszystkich flawonoidów spadają. Można zatem przypuszczać, że głównym mechanizmem retencji zachodzącym na sulfobetainowej fazie stacjonarnej jest właśnie hydrofilowy podział. Jednak ten wniosek wydaje się być sprzeczny z wynikami wcześniej przedstawionych badań. Związek pomiędzy współczynnikiem retencji a temperaturą kolumny określa izoterma van't Hoffa. Jeżeli mechanizm, według którego zachodzi rozdzielanie jest oparty o hydrofilowy podział, zależność ta powinna być liniowa (szerzej opisano to zagadnienie w podrozdziale 1.4). Sprawdzone liniowość izotermy van't Hoffa stosując zarówno acetonitryl jak i metanol. Pomiary prowadzono stosując eluent złożony z 95% rozpuszczalnika i wody. Wyniki przedstawiono na rysunku 45.



Rys. 45. Przebiegi zależności van't Hoffa dla flawonoidów. Kolumna *p*ZIC-HILIC.

Prostoliniowe zależności izoterm van't Hoffa potwierdzają tezę o hydrofilowym podziale, jako decydującym mechanizmie retencji badanych flawonoidów na złożu sulfobetainowym. Wszystkie związki charakteryzują się także ujemnymi wartościami entalpii, co sugeruje, że ich rozdzielenie jest procesem egzotermicznym. Rozdzielenie flawonoidów z zastosowaniem sulfobetainowego złoża zależy zatem w dużej mierze od członu entalpowego izotermi van't Hoffa. Jest to cecha kolumn ZIC-HILIC [31]. Wyznaczone zależności termodynamiczne charakteryzowały się dużymi współczynnikami dopasowania (powyżej 0,9 z wyjątkiem kwercetyny i chryzyny w MeOH), co przedstawia tabela 20.

Tabela 20. Wartości zmiany entalpii procesu rozdzielania flawonoidów na kolumnie *p*ZIC-HILIC.

Nazwa związku	ACN		MeOH	
	ΔH [kJ/mol]	R^2	ΔH [kJ/mol]	R^2
Chryzyna	-12,2	0,999	-33,2	0,818
Apigenina	-7,89	0,939	-9,11	0,970
Kemferol	-10,5	0,999	-9,88	0,980
Luteolina	-8,49	0,982	-16,4	0,973
Kwercetyna	-7,56	0,954	-26,9	0,882
Moryna	-12,6	0,942	-20,4	0,980
Ramentyna	-7,82	0,969	-22,6	0,968
Mirycetyna	-10,8	0,976	-12,4	0,954
Genisteina	-8,10	0,986	-16,4	0,975
Katechina	-61,3	0,903	-25,5	0,981
Rutyna	-3,18	0,932	-29,1	0,962
Naringenina	-10,2	0,989	-13,4	0,951
Naringina	-17,3	0,958	-22,4	0,957
Kwercytryna	-9,89	0,956	-22,3	0,979
Hesperydyna	-18,56	0,998	-23,93	0,986
Hesperetyna	-13,45	0,916	-14,95	0,920

6.6.4. Parametry analityczne i chromatogramy mieszanin wzorcowych

Duża zawartość rozpuszczalnika organicznego w fazach ruchomych stosowanych w HILIC wpływa na czułość detekcji z zastosowaniem spektrometrii mas. Parametry krzywych kalibracji oraz wyznaczone granice wykrywalności dla analizowanych związków, wykorzystując fazę ruchomą zawierającą 95% rozpuszczalnika organicznego (ACN lub MeOH) i wodę prezentuje tabela 21.

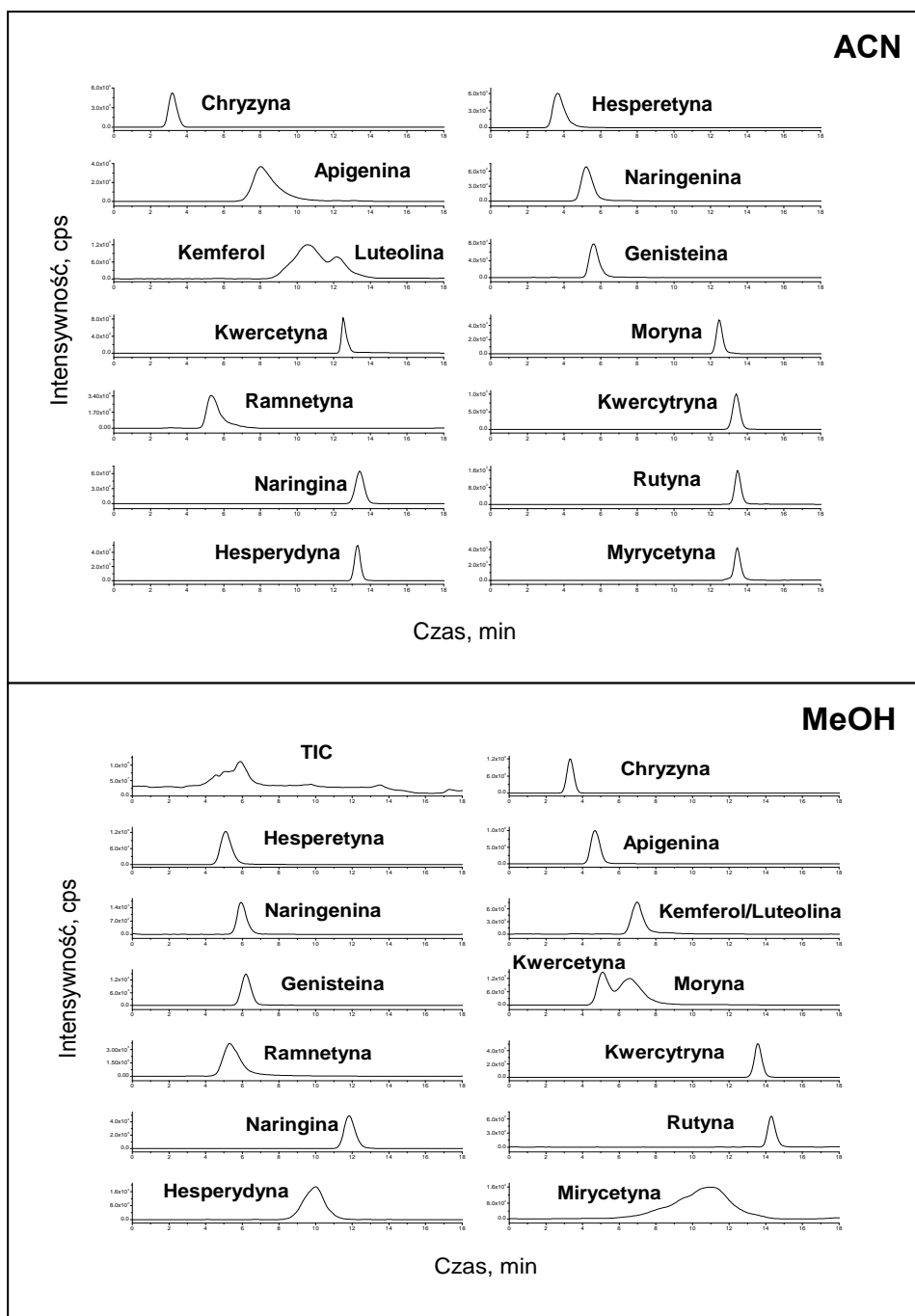
Tabela 21. Parametry kalibracji flawonoidów dla kolumny *p*ZIC-HILIC z zastosowaniem faz ruchomych zawierającymi acetonitryl lub metanol.

	ACN			MeOH		
	LOD [mg/l]	a	R ²	LOD [mg/l]	a	R ²
Chryzyna	0,1	316000	0.962	0,1	1690000	0.998
Hesperetyna	0,1	403000	0.997	0,1	952000	0.995
Moryna	0,1	962000	0.999	0,1	1710000	0.999
Genisteina	0,1	240000	0.998	0,1	408000	0.993
Naringenina	0,1	692000	0.997	0,1	5640000	0.997
Apigenina	0,1	340000	0.990	0,1	3260000	0.994
Ramnetyna	0,1	2470000	0.999	0,1	5030000	0.996
Kempferol	0,1	95400	0.984	0,1	3010000	0.998
Luteolina	0,1	1320000	0.999	0,1	7790000	0.995
Kwercetyna	0,25	619000	0.999	0,25	2290000	0.994
Mirycetyna	0,1	1880000	0.999	0,1	2510000	0.998
Kwercytryna	0,1	6340000	0.999	0,1	7240000	0.999
Hesperydyna	0,1	20600	0.999	0,1	36100	0.997
Naringina	0,1	1130000	0.999	0,1	1810000	0.996
Rutyna	0,25	59100	0.998	0,25	45000	0.999

a - nachylenie krzywej kalibracyjnej

Większą czułość oznaczeń (w oparciu o nachylenia krzywych) otrzymano dla metanolu, szczególnie dla kwercetyny, naringeniny i ramnetyny. Zastąpienie acetonitrylu metanolem powoduje spadek czułości dla rutyny. Zastosowanie alkoholu jako składnika eluentu powoduje koelucję sygnałów pochodzących od kemferolu oraz luteoliny oraz hesperetyny i kwercetyny. Nie zauważono jakiegokolwiek wpływu rodzaju stosowanego rozpuszczalnika organicznego na granicę wykrywalności dla flawonoidów. W obydwu przypadkach wynosiła ona 0,1 ,g/L (wyjątek rutyna i kwercetyna 0,25 mg/L).

Czas pojedynczej analizy mieszaniny flawonoidów z zastosowaniem kolumny *p*ZIC-HILIC i elucji izokratycznej bardzo zależy od czasu retencji katechiny (zagadnienie szerzej omówione zostało w rozdziale 8), która jest wymywana z kolumny jako ostatnia w czasie retencji równym 100,2 min (ACN) lub 81,5min (MeOH). Dlatego też zdecydowano się na zastosowanie elucji gradientowej. Chromatogramy otrzymane w tych warunkach przedstawiono na rysunku 46.



Rys. 46. Chromatogramy otrzymane w elucji gradientowej z zastosowaniem ACN lub MeOH jako rozpuszczalnika organicznego fazy ruchomej dla kolumny *p*ZIC-HILIC. Program gradientu: 0-4 min 98% B, 6-7 min 90% B, 8-8,4 min 80% B, 8,4-12 min 50% B, 13-20 min 98% B, gdzie A-woda, B-rozpuszczalnik organiczny.

Porównano także obydwa rozpuszczalniki organiczne pod kątem efektywności rozdzielania z ich zastosowaniem. Warunki otrzymane w elucji izokratycznej zestawiono w tabeli 22.

Tabela 22. Sprawność rozdzielania flawonoidów z zastosowaniem kolumny *p*ZIC-HILIC. Faza ruchoma 95% ACN lub MeOH/woda

	95% ACN/woda			95% MeOH/woda		
	w _{1/2}	As	N /m	w _{1/2}	As	N /m
Kwercetyna	1,23	5,65	90992	0,978	3,67	48364
Apigenina	0,420	2,38	25119	0,430	2,95	24992
Kemferol	0,800	3,16	9245	0,920	4,16	10979
Luteolina	0,753	5,57	21791	0,846	4,00	15888
Ramnetyna	0,474	3,62	16261	0,630	4,27	16922
Mirycetyna	2,05	1,20	9138	1,87	5,00	107754
Genisteina	0,375	1,15	26246	0,470	2,03	32776
Katechina	2,34	1,42	456628	2,270	1,25	318252
Rutyna	1,57	1,21	146600	1,69	1,15	91379
Naringenina	0,536	2,02	10992	0,597	2,25	18843
Naringina	1,20	1,78	157866	0,675	2,42	49131
Moryna	0,923	1,18	27727	0,930	1,38	19777
Kwercytryna	1,05	1,20	297015	0,834	1,15	93453
Hesperydyna	0,900	2,33	99356	0,760	3,25	20610
Hesperetyna	0,570	2,92	7530	0,425	2,82	30015
Chryzyna	0,310	1,15	24172	0,300	1,10	28748

w_½- szerokość pików w połowie wysokości [min], N – liczba pól teoretycznych, As – współczynnik asymetryczności pików

Lepsze sprawności rozdzielania przekładające się na liczbę pól teoretycznych na metr kolumny uzyskano dla MeOH. Jednakże w tych warunkach obserwowane jest zjawisko koelucji kemferolu i luteoliny oraz hesperydyny i rutyny. Rozdzielenie tych flawonoidów jest możliwe tylko jeśli zastosuje się acetonitryl.

6.7. Kolumna ZIC- HILIC

6.7.1. Wpływ podłoża modyfikacji na selektywność rozdzielania i retencję flawonoidów

Baza modyfikacji kolumny może mieć wpływ na sprawność rozdzielania. Dodatkowe oddziaływania z grupami silanolowymi w wielu przypadkach w znaczący sposób wpływają na selektywność kolumny. W toku badań porównano sprawność rozdzielania z zastosowaniem dwóch kolumn zawierających sulfobetainowy ligand, jednak o różnych matrycach modyfikacji: krzemionce i polimerze. Dodatkowe oddziaływania z bazą modyfikacji znacząco wpłynęły na kolejność retencji, co przedstawiono poniżej:

Kolumna ZIC-HILIC o krzemionkowej bazie modyfikacji:

HET < CHR < AP < MOR < RAM < NAG < GEN < KAM < LUT < HED < Q < NA < QC < MYR < KAT < RUT

Kolumna *p*ZIC-HILIC o polimerycznej matrycy modyfikacji:

CHR < HET < NAG < RAM < GEN < AP < KAM < LUT < MOR < HED < Q < NA < QC < RUT < MYR < KAT

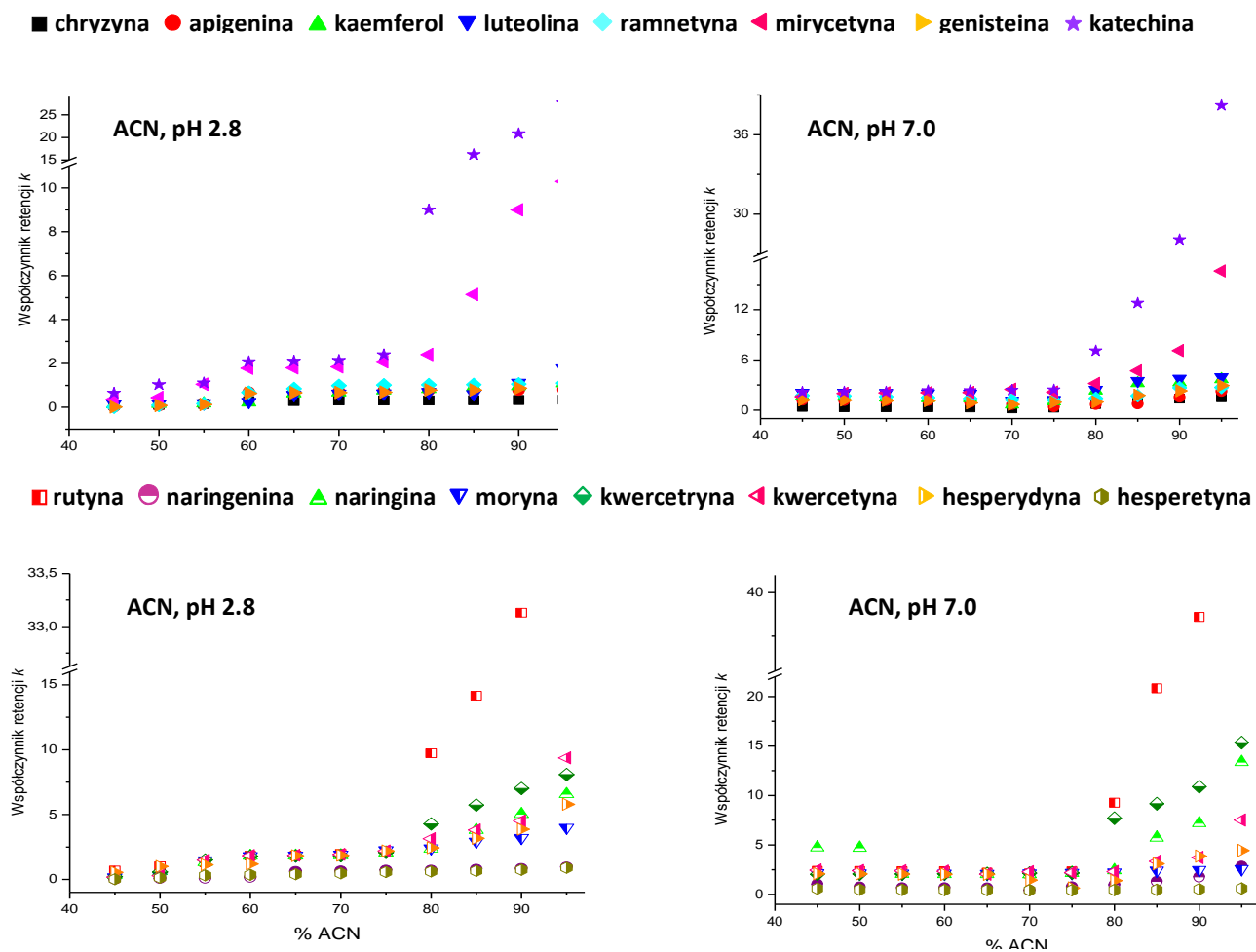
Największy wpływ matrycy modyfikacji kolumny na retencję zauważono w przypadku rutyny. Jej oddziaływania z grupami silanolowymi są tak duże, że w warunkach elucji izokratycznej (95% ACN/woda) nie jest ona wymywana z kolumny w czasie 120 min, podczas, gdy jej czas retencji w analogicznych warunkach wynosi 38,24 min na kolumnie *p*ZIC-HILIC. Zmiana kolumny na silikażelową spowodowała znaczne skrócenie czasu retencji katechiny, co sugeruje występowanie odpychających oddziaływań między analitem a bazą modyfikacji. Zmiana acetonitrylu na metanol w przypadku kolumny ZIC-HILIC nie spowodowała znaczących zmian w kolejności retencji flawonoidów. W przypadku zastosowania kolumny ZIC-HILIC pojawiają się trudności z rozdzieleniem hesperetyny, moryny i kwercetyny. W przypadku zastosowania metanolu, obserwowana jest koelucja hesperetyny i moryny. Do ich rozdzielania konieczne jest zastosowanie acetonitrylu. Analogiczną sytuację zauważono w przypadku kemferolu i luteoliny.

6.7.2. Wpływ pH i zawartości rozpuszczalnika organicznego w fazie ruchomej na retencję flawonoidów

Badanie wpływu pH fazy ruchomej przeprowadzono z zastosowaniem kwasu mrówkowego (pH 2,8) oraz octanu amonu (pH 7) jako składników faz ruchomych. Wartości pH odnoszą się właśnie do tych składników. Należy pamiętać, że charakterystyczną cechą eluentów stosowanych w chromatografii HILIC jest duża zawartość rozpuszczalników organicznych. Badania empiryczne dowodzą jednak, że każdy dodatek 10% acetonitrylu, skutkuje podwyższeniem pH o 0,3 jednostki. Zatem kwestia wpływu pH fazy ruchomej jako całości nie jest w przypadku chromatografii oddziaływań hydrofilowych prosta. Badania prowadzono stosując fazę ruchomą zawierającą 95% rozpuszczalnika organicznego. Zauważono pewne zależności retencji analitów przy zmianie pH składnika wodnego. W przypadku użycia ACN obserwowany jest wzrost czasu retencji wraz ze wzrostem pH komponenta wodnego. Dla bardziej polarnych flawonoidów różnica w czasach retencji jest znacząca. Czas retencji katechiny wydłuża się z 47 min (pH 2,8) do 60 min (pH 7), naringiny z 11,6 do 22min, kwercytriny z 14 do 25 min. Podobne prawidłowości zauważono także dla pozostałych analizowanych związków, jednak ze względu na ich mniejszą polarność, różnice w czasach retencji nie są tak duże. W pH 2,8 flawonoidy są niezdisocjowane, przez co mniej polarne, dlatego też hydrofilowy podział, nawet jeśli odgrywa dużą rolę w ich mechanizmie retencji jest mocno ograniczony przez umiarkowaną polarność analitów. Wraz ze wzrostem pH do 7, flawonoidy są w mniejszym bądź większym stopniu zdysocjowane. Przekłada się to na wzrost ich polarności a tym samym na wzrost udziału hydrofilowego podziału w ich mechanizmie rozdzielania. Najbardziej ciekawy jest jednak wpływ pH fazy ruchomej na retencję rutyny. Niezależnie od pH komponenta wodnego jest ona niewymywana z kolumny przez 120 min. Jednak minimalny dodatek buforu gwałtownie obniża jej retencję. I tak, gdy zastosujemy wodę jako składnik eluentu czas retencji rutyny jest dłuższy niż 120 min. Jednak zastosowanie buforu o tej samej wartości pH powoduje skrócenie jej czasu retencji do 40 min. Sugeruje to, że kluczowe dla mechanizmu retencji rutyny są jej oddziaływania elektrostatyczne ze złożem. W sytuacji pojawienia się przeciw jonów z buforu jest ona wypierana ze złoża (mechanizm ERLIC). Ta obserwacja może być kluczowa w przypadku podjęcia elucji izokratycznej mieszaniny flawonoidów z zastosowaniem maksymalnej ilości rozpuszczalników organicznych. W przypadku zamiany acetonitrylu na

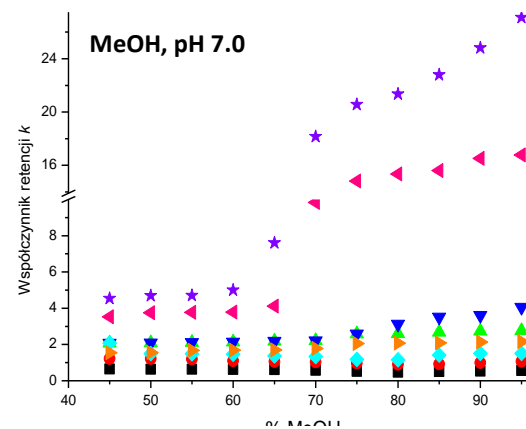
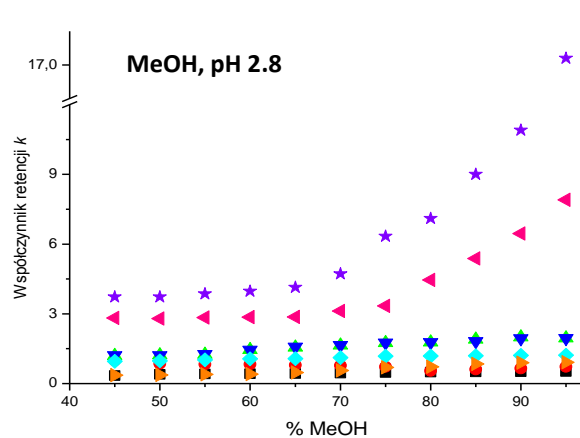
metanol również zauważono wzrost wartości współczynników retencji wraz ze wzrostem pH. Tutaj także znaczący jest wzrost udziału hydrofilowego podziału w mechanizmie rozdzielania wraz ze wzrostem pH. Znaczącą różnicą między metanolem a acetonitrylem jest retencja rutyny. W przypadku zastosowania metanolu jest ona wymywana w każdym pH. Metanol ma zdolność do tworzenia wiązań wodorowych, przez co także może konkurować z rutyną o ich utworzenie ze złożem. Potwierdza to hipotezę o dużym ich udziale w mechanizmie retencji rutyny.

W badanym zakresie pH 2,8-7 (wyższy zakres pH nie był możliwy ze względu na krzemionkową bazę modyfikacji) flawonoidy powinny być niezdysocjowane. W tych warunkach można mówić o znikomych oddziaływaniach elektrostatycznych, natomiast głównym mechanizmem retencji powinien być hydrofilowy podział analitu bądź też jego adsorpcja na powierzchni złoża. Współczynniki retencji wyznaczono stosując zarówno acetonitryl jak i metanol jako główny składnik faz ruchomych. W obydwu przypadkach wraz ze wzrostem zawartości rozpuszczalnika organicznego, współczynniki retencji rosną. W przypadku acetonitrylu otrzymano wyższe współczynniki retencji niż dla metanolu (rys 48).

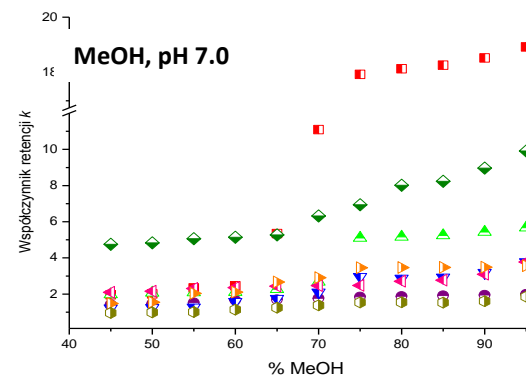
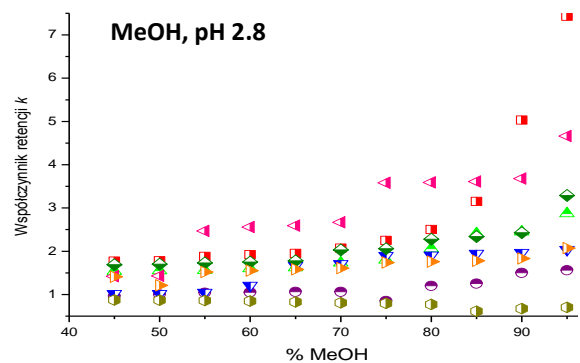


Rys. 47. Zależność współczynników retencji flawonoidów od zawartości acetonitrylu w fazie ruchomej dla kolumny ZIC-HILIC.

■ chryzyna ● apigenina ▲ kaemferol ▼ luteolina ◆ ramnetyna ▲ mirycetyna ► genisteina ★ katechyna



■ rutyna ● naringenina ▲ naringina ▼ moryna ◆ kwercetyna ▲ kwercetyna ► hesperydyna ● hesperetyna



Rys. 48. Zależność współczynników retencji flawonoidów od zawartości metanolu w fazie ruchomej dla kolumny ZIC-HILIC.

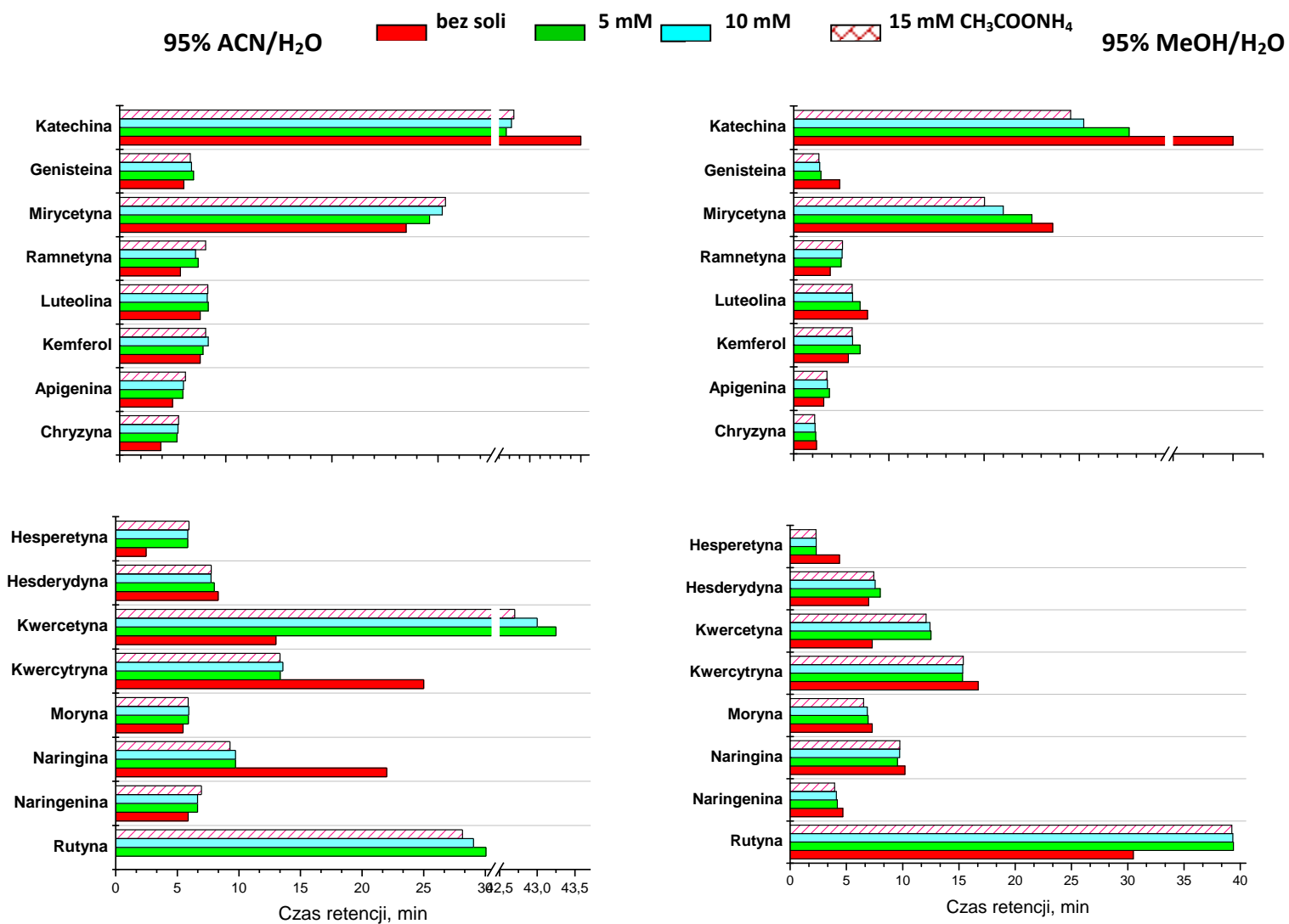
Wyższe wartości współczynników retencji dla acetonitrylu otrzymano w pH 7. W tym pH grupy silanolowe są zdeprotonowane i obdarzone ładunkiem ujemnym. Razem z grupami sulfonowymi, pochodzącymi od modyfikacji krzemionki sprawiają, że złoże posiada wypadkowy ładunek ujemny na powierzchni. Najbardziej zatrzymywanym analitem jest rutyna. W elucji izokratycznej (stosując 95% ACN) jej czas retencji jest dłuższy niż 120 min. Można przypuszczać, że odpowiedzialne za to są dodatkowe oddziaływania z grupami silanolowymi, pochodzącymi z bazy modyfikacji. Rutyna, jako jeden z bardziej polarnych związków ma zdolność do tworzenia wiązań wodorowych, przez co pojawiają się trudności z wymyciem tego analitu z kolumny. W przypadku zastąpienia acetonitrylu metanolem obserwuje się znaczne skrócenie czasu retencji rutyny do 30,5 min. Jest on wymywana przed katechiną ($t_R=49$ min). Metanol ma zdolność do tworzenia wiązań wodorowych, przez co stosując eluent, w którym jest on głównym składnikiem, można spodziewać się mniej polarnej warstwy wodnej, jednakże o większej grubości (w stosunku do acetonitrylu). Ta grubość znacznie utrudnia analitom dostęp do powierzchni złoża (a tym bardziej do grup silanolowych). Co więcej, częściowe zastąpienie cząsteczek wody cząsteczkami metanolu, czyni warstwę wodną mniej polarną, co nie sprzyja wydłużaniu retencji polarnych analitów. Można zatem przypuszczać, że skoro warstwa wodna jest znacząco grubsza, gdy składnikiem eluentu jest metanol, to prawdopodobieństwo rozdzielania według modelu podziałowego jest duże. Anality mają utrudniony dostęp do powierzchni fazy stacjonarnej i są niejako zawieszone w wodnej warstwie, utrudniającą dostęp do złoża.

6.7.3. Wpływ stężenia soli na retencję flawonoidów

Zbadano wpływ stężenia soli w eluencie na retencję flawonoidów. Do badań użyto roztworów octanu amonu o stężeniach 5, 10 i 15 mmol/l. Zarówno w przypadku acetonitrylu jak i metanolu nie zauważono jednego wyraźnego wpływu obecności soli na retencję analitów. W przypadku acetonitrylu wraz ze wzrostem stężenia octanu amonu rośnie czas retencji dla mirycetyny, ramnetyny, luteoliny, apigeniny chryzyny, hesperetyny i naringeniny. Świadczyć to może o podziałowym mechanizmie rozdzielania tych związków ale też sugerować oddziaływania elektrostatyczne lub wymianę jonową. Dodatek soli do eluentu powoduje wzrost polarności warstwy wodnej na powierzchni złoża. Powoduje to wzrost

atrakcyjności tej warstwy dla polarnych analitów. Z drugiej jednak strony, obecność jonów z eluentów czyni mechanizm rozdzielania jeszcze trudniejszym do zdefiniowania. Wysycenie warstwy wodnej jonami powoduje, że analit może oddziaływać elektrostatycznie nie tylko z grupami ze złoża kolumny ale także z jonami obecnymi w warstwie wodnej. Oddziaływania te mogą być zarówno odpychające jak i przyciągające i mogą mieć kluczowe znaczenie dla retencji związków. I tak wzrost stężenia jonów spowodował skrócenie czasów retencji dla katechiny, genisteiny, kemferolu, hesperydyny, kwercetyny, kwercytryny, moryny, naringiny i rutyny. Wszystkie te flawonoidy cechują się znaczącą retencją w porównaniu do pozostałych. Spadek ich retencji można tłumaczyć znaczącym udziałem oddziaływań elektrostatycznych z fazą stacjonarną, gdy składnikiem eluentu jest woda. Po dodaniu soli anality muszą konkurować z jonami pochodzącymi z soli o miejsce oddziaływania z fazą stacjonarną, co może skracać ich retencję. Dodatkowo na skutek wystąpienia mechanizmu ERLIC, mogą one być wypychane z warstwy wodnej przez jony tego samego znaku będące już w warstwie wodnej. W pH 7, w którym prowadzono badania, flawonoidy są w mniejszym, bądź większym stopniu zdysocjowane, więc taki mechanizm też może być prawdopodobny.

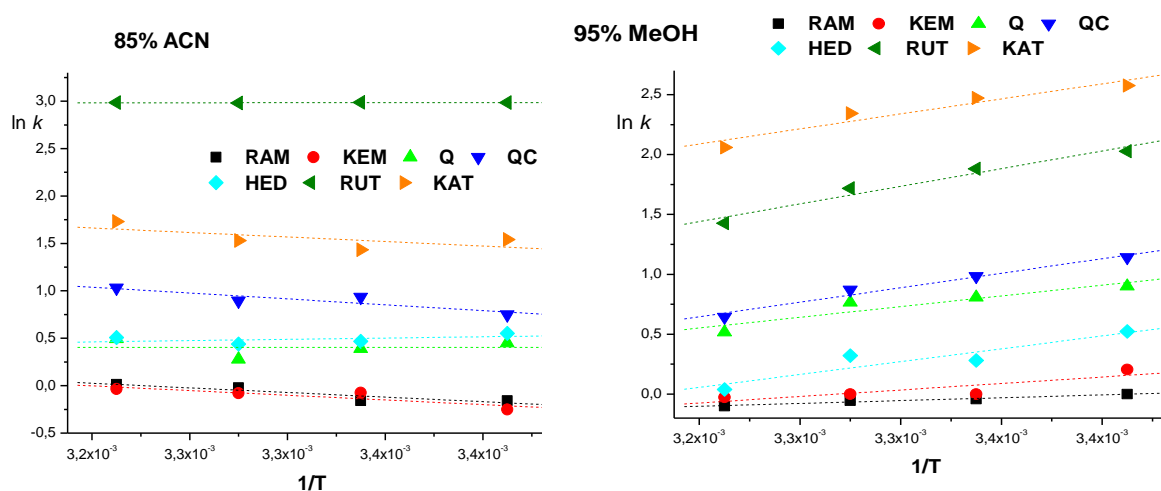
Jednakowego trendu dla wszystkich badanych związków nie wykazano także stosując metanol jako komponent warstwy wodnej. W tym przypadku wzrost wartości współczynników retencji wraz ze wzrastającym stężeniem soli w eluencie zaobserwowano dla ramnetyny, kemferolu oraz rutyny. Odwrotną sytuację, a więc spadek retencji wraz ze wzrostem stężenia buforu nieorganicznego w eluencie zaobserwowano dla katechiny, genisteiny, mirycetyny, luteoliny, hesperetyny oraz kwercytryny. W przypadku wzrostu czasów retencji, można wnioskować o dodatkowych oddziaływaniach elektrostatycznych między analitami a jonami z warstwy wodnej, co wydłuża retencję. Dla niewymienionych analitów nie zaobserwowano wpływu stężenia soli w eluencie na ich czasy retencji. Uzyskane wyniki dla faz ruchomych zawierających zarówno acetonitryl jak i metanol, przedstawia rysunek 49.



Rys. 49. Wpływ stężenia octanu amonu na czasy retencji flawonoidów.

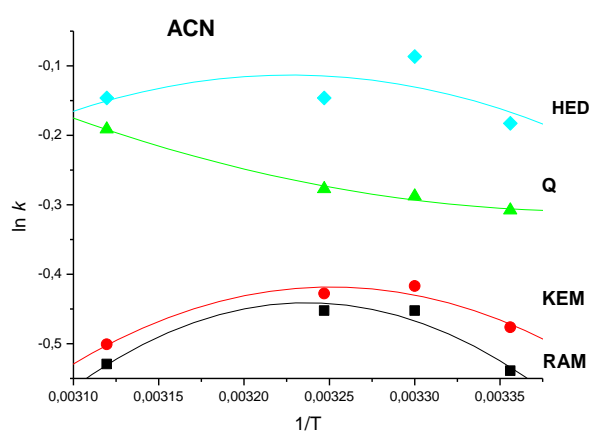
6.7.4. Wpływ temperatury na retencję flawonoidów

W przypadku zastosowania metanolu, wraz ze wzrostem temperatury, czasy retencji wszystkich analizowanych analitów maleją na kolumnie ZIC-HILIC. Może to sugerować mechanizm rozdzielania zachodzący według mechanizmu podziałowego. W przypadku użycia acetonitrylu brak jest jednego, dominującego wpływu temperatury na retencję flawonoidów. Dla niektórych zauważono nieznaczny wzrost czasu retencji wraz ze wzrostem temperatury (np. ramnetyna, kemferol) lub brak wpływu temperatury na retencję. Należy jednak brać pod uwagę, że wpływ ten, niezależnie od kierunku zmiany retencji jest bardzo mały, dla analitów słabo zatrzymywanych, nawet trudny do zbadania. Sprawdzono liniowość izoterm van't Hoffa stosując zarówno acetonitryl, jak i metanol. Pomiary prowadzono stosując eluent złożony z 95% metanolu i wodę lub 85% acetonitrylu i wodę (ze względu na trudności z wymyciem rutyny w warunkach izokratycznych). Przykładowe przebiegi krzywych prezentuje rysunek 50.



Rys 50. Przebiegi zależności van't Hoffa dla wybranych flawonoidów dla kolumny ZIC-HILIC.

Lepsze współczynniki korelacji dla badanych związków uzyskano w przypadku metanolu (współczynniki korelacji w zakresie 0,93-0,99). Sugeruje to, że główny mechanizm retencji zachodzący w tych warunkach to hydrofilowy podział analitu. Dla acetonitrylu otrzymane zależności były znacząco niższe. Aby wykluczyć wpływ różnej zawartości rozpuszczalnika organicznego w eluencie, sprawdzono wpływ temperatury dla wymywanych w tych warunkach związków, stosując fazę ruchomą 95% acetonitrylu i wodę. Otrzymane współczynniki korelacji były jeszcze niższe niż to miało miejsce dla eluentu zawierającego 85% acetonitrylu (rys. 51).



Rys. 51. Przebiegi zależności van't Hoffa dla wybranych flawonoidów dla kolumny ZIC-HILIC.

Uzyskane wyniki wyraźnie sugerują, że mechanizm rozdzielania zachodzący z wykorzystaniem eluentu zawierającego acetonitryl nie opiera się na podziale analitu między warstwę wodną a fazę ruchomą. Gdyby tak było, uzyskane przebiegi izoterm van't Hoffa powinny być prostoliniowe. Znaczące odchylenie od tej prostoliniowości może wskazywać na znaczący udział adsorpcji a także występowania wiązań wodorowych i oddziaływań elektrostatycznych w mechanizmie rozdzielania. Wyznaczono także wartości entalpii dla analizowanych związków. Posłużono się takimi składami eluentów, aby w badanym zakresie izoterm van't Hoffa miały prostoliniowy przebieg. Jest to kluczowe szczególnie dla acetonitrylu, dla którego wraz ze wzrostem zawartości procentowej rozpuszczalnika organicznego izotermie te coraz bardziej odbiegają od prostoliniowości. Uzyskane wyniki dla wybranych flawonoidów przedstawia tabela 23.

Tabela 23. Wartości entalpii procesu rozdzielania flawonoidów na kolumnie ZIC-HILIC.

Eluent: 95% ACN lub MeOH/woda

Związek	ACN		MeOH	
	ΔH	R^2	ΔH	R^2
	[kJ/mol]		[kJ/mol]	
Chryzyna	0,125	0,045	-1,58	0,742
Apigenina	-0,154	0,635	-12,65	0,851
Kemferol	10,03	0,883	-10,99	0,858
Luteolina	12,35	0,756	-14,30	0,867
Kwercetyna	0,108	0,001	-18,44	0,931
Moryna	0,157	0,010	-16,32	0,852
Ramentyna	10,09	0,921	-4,86	0,985
Mirycetyna	0,169	0,328	-20,52	0,754
Genisteina	-0,105	0,525	-13,32	0,913
Katechina	10,18	0,658	-25,98	0,960
Rutyna	-	-	-30,47	0,978
Naringenina	-0,103	0,854	-9,251	0,892
Naringina	0,432	0,021	-17,60	0,745
Kwercytryna	12,53	0,900	-24,91	0,987
Hesperydyna	-2,65	0,466	-21,96	0,922
Hesperetyna	0,135	0,021	-15,37	0,900

Zgodnie z charakterystyką kolumn o podłożu sulfobetainowym, rozdzielanie w dużej mierze zależy od członu entalpowego. W przypadku zastosowania metanolu, wszystkie związki charakteryzują się także ujemnymi wartościami entalpii, co sugeruje, że ich rozdzielanie jest procesem egzotermicznym. Współczynniki dopasowania tej zależności są wysokie i wynoszą powyżej 0,9 (wyjątek kemferol). Sytuacja zmienia się gdy zastosujemy acetonitryl jako składnik eluentu. W zależności od konkretnego związku, otrzymano zarówno dodatnie jak i ujemne wartości entalpii. Na uwagę zasługują także bardzo niskie współczynniki korelacji (dla kwercetyny współczynnik korelacji wynosi 0,0010). Można zatem stwierdzić, że w przypadku acetonitrylu hydrofilowy podział (który w teorii sugerują prostoliniowe przebiegi krzywych van't Hoffa) nie jest mechanizmem retencji w tych warunkach. Na przykładzie wpływu temperatury na selektywność rozdzielania można

zobaczyć jak kluczowy dla całego rozdzielania jest dobór rozpuszczalnika organicznego, który będzie składnikiem fazy ruchomej. Jest to zgodne z założeniami chromatografii HILIC, ponieważ hydrofilowy podział można rozpatrywać jako podział w układzie ciecz-ciecz, a wtedy najbardziej istotne jest właśnie dobranie tych dwóch cieczy.

6.7.5. Parametry analityczne i chromatogramy mieszanin wzorcowych

Sporządzono krzywe kalibracji oraz wyznaczono granicę wykrywalności dla analizowanych związków, wykorzystując fazę ruchomą zawierającą 95% rozpuszczalnika organicznego (ACN lub MeOH) i 8 mM octanu amonu (pH 7). Dodatek soli został zastosowany ze względu na trudności z wymyciem rutyny, gdy eluentem jest 95% ACN i woda. Wyniki prezentuje tabela 24.

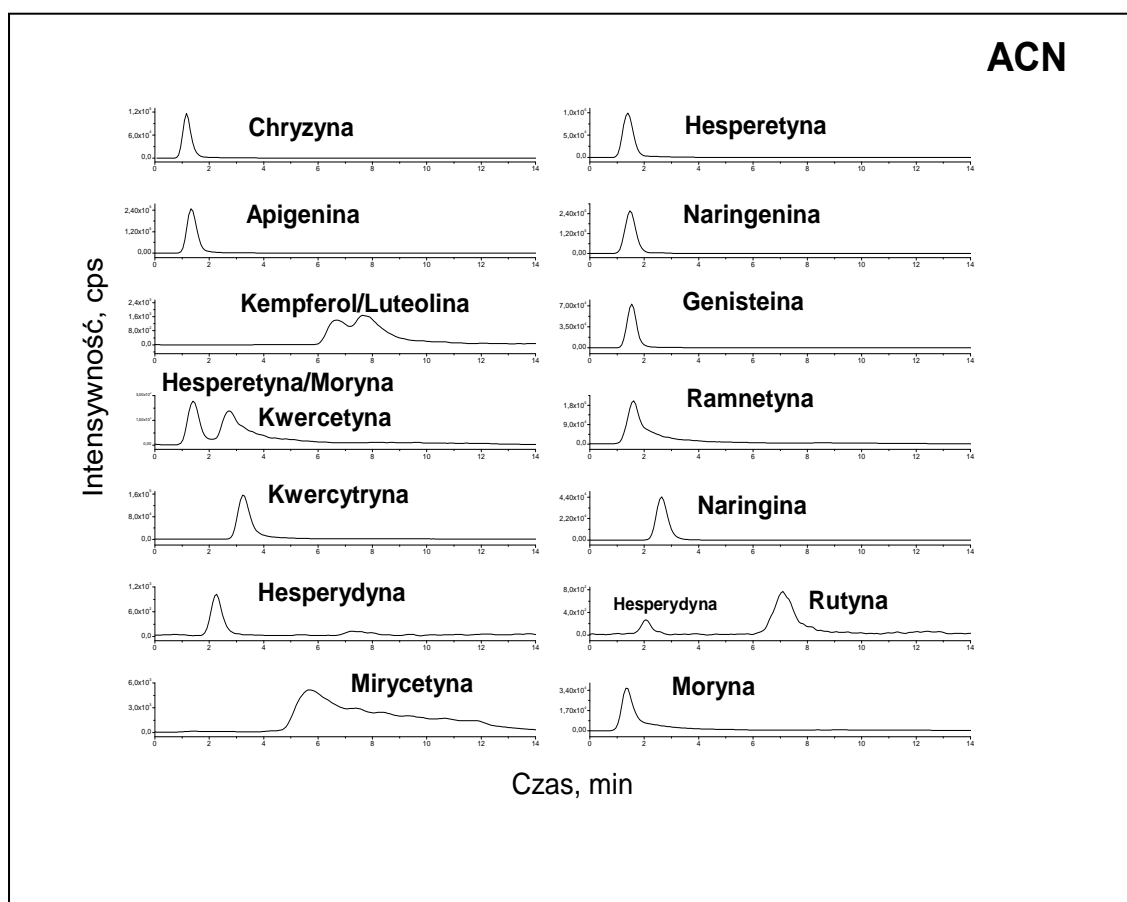
Tabela 24. Parametry kalibracji flawonoidów z zastosowaniem faz ruchomych zawierającymi acetonitryl lub metanol.

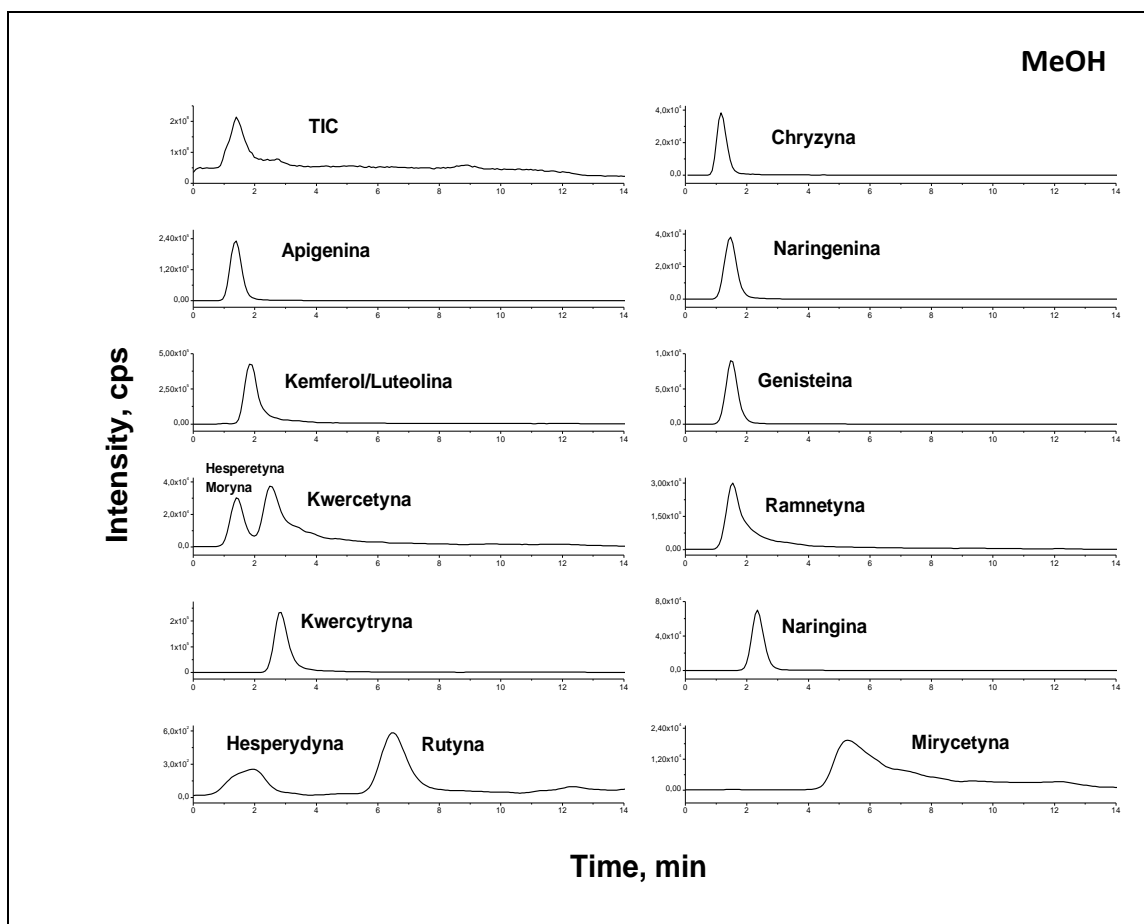
	ACN			MeOH		
	LOD [mg/l]	a	R ²	LOD [mg/l]	a	R ²
Chryzyna	0,01	2070000	0.976	0,01	3870000	0.986
Hesperetyna	0,01	60385	0.985	0,01	65400	0.999
Moryna	0,01	1942000	0.998	0,01	1250000	0.989
Genisteina	0,01	2730000	0.994	0,01	608000	0.999
Naringenina	0,01	7314000	0.998	0,01	8513000	0.993
Apigenina	0,01	109168	0.902	0,01	211000	0.990
Ramnetyna	0,01	94465	0.958	0,01	107000	0.991
Kempferol	0,01	182000	0.983	0,01	199000	0.999
Luteolina	0,01	1530000	0.993	0,01	2370000	0.993
Kwercetyna	0,5	448000	0.999	0,25	563000	0.999
Mirycetyna	0,01	128100	0.989	0,01	432000	0.998
Kwercytryna	0,01	108150	0.992	0,01	542000	0.999
Hesperydyna	0,01	45720	0.843	0,01	39500	0.996
Naringina	0,01	310000	0.998	0,01	2341000	0.998
Rutyna	0,5	48669	0.948	0,25	36150	0.998

a - nachylenie krzywej kalibracyjnej

Zastosowanie alkoholu jako składnika eluentu powoduje koelucję sygnałów pochodzących od kemferolu oraz luteoliny oraz hesperetyny, moryny i kwercetyny. Rozdzielenie tych flawonoidów możliwe jest tylko z zastosowaniem acetonitrylu jako składnika fazy ruchomej. Podobnych obserwacji dokonano stosując kolumnę *p*ZIC-HILIC. Porównano także granice oznaczalności dla obydwu eluentów. Zauważono różnice jedynie w wartościach uzyskanych dla kwercetyny i rutyny. W przypadku zastosowania metanolu, granica oznaczalności dla tych związków była niższa i wynosiła 0,25 mg/L. Jest to związane przede wszystkim ze znacznym skróceniem czasów retencji tych związków.

Do rozdzielania badanych flawonoidów zdecydowano się zastosować elucję gradientową. Pomogło to znacznie skrócić czas pojedynczej analizy (poprzez skrócenie czasów retencji rutyny i katechiny) bez strat na efektywności. Rozdzielenie przeprowadzono stosując acetonitrylu oraz metanol (rys. 52).





Rys. 52. Chromatogramy otrzymane w elucji gradientowej z zastosowaniem A-ACN lub B-MeOH jako rozpuszczalnika organicznego fazy ruchomej dla kolumny ZIC-HILIC. Program gradientu: 0-4 min 98% B, 6-7 min 90% B, 8-8,4 min 80% B, 8,4-12min 50% B, 13-20min 98% B, gdzie A-woda, B-rozpuszczalnik organiczny.

Porównano także obydwa rozpuszczalniki organiczne pod kątem sprawności rozdzielania z ich zastosowaniem. Warunki otrzymane w elucji izokratycznej zestawiono w tabeli 25.

Tabela 25. Sprawności rozdzielania flawonoidów na kolumnie ZIC-HILIC. Eluent: 95% ACN lub MeOH/woda.

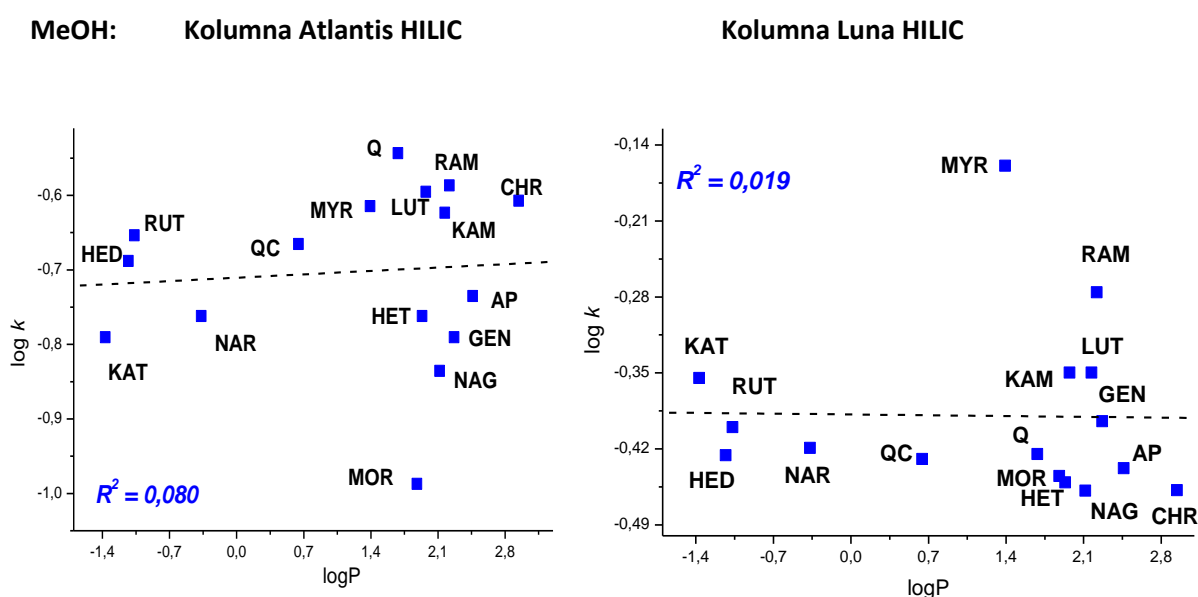
	95% ACN/woda			95% MeOH/woda		
	w _{1/2}	As	N /m	w _{1/2}	As	N /m
Kwercetyna	3,25	5,65	4060	2,36	3,67	1560
Apigenina	0,466	2,38	6327	0,25	2,95	1250
Kemferol	1,52	3,16	34570	1,10	4,16	790
Luteolina	1,45	5,57	15300	1,15	4,00	1970
Ramnetyna	0,739	3,62	20610	0,473	4,27	1140
Mirycetyna	8,36	1,20	680	5,25	5,00	670
Genisteina	0,583	1,15	7370	1,05	2,03	1590
Katechina	3,17	1,42	2780	2,25	1,25	16030
Rutyna	-	-	-	5,59	1,15	5910
Naringenina	0,628	2,02	7570	0,808	2,25	1110
Naringina	0,96	1,78	126010	0,653	2,42	2720
Moryna	1,41	1,18	8940	0,253	1,38	490
Kwercytryna	0,498	1,20	2490	0,415	1,15	3160
Hesperydyna	0,425	2,33	114350	1,09	3,25	2090
Hesperetyna	0,576	2,92	7560	0,529	2,82	850
Chryzyna	0,425	1,15	1640	0,473	1,10	800

w_½ - szerokość piku w połowie wysokości [min], N - liczba póltek teoretycznych,
As – współczynnik asymetryczności piku

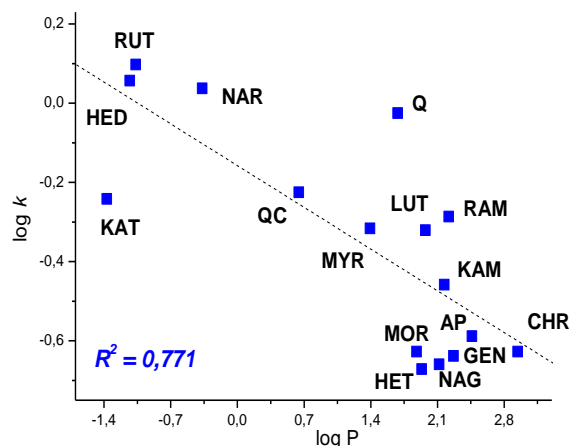
7. Dyskusja o mechanizmie retencji flawonoidów w chromatografii HILIC

7.1. Kolumna Altantis HILIC i Luna HILIC

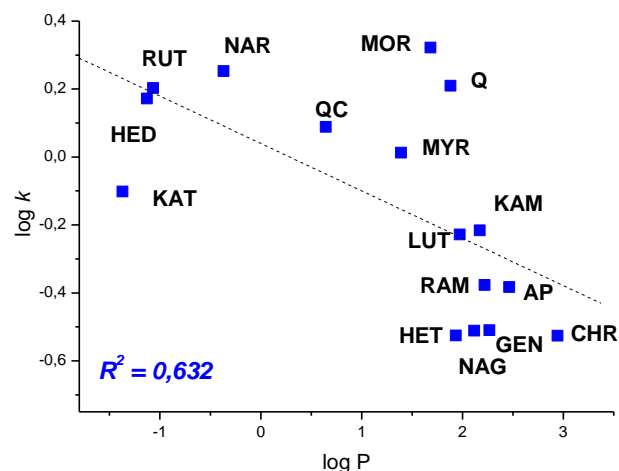
Teoria chromatografii oddziaływań hydrofilowych postuluje, że głównym mechanizmem retencji powinien być hydrofilowy podział analitu między warstwę wodną zaadsorbowaną na powierzchni hydrofilowego złoża a niepolarny eluent. Wówczas retencja flawonoidów powinna być zależna przede wszystkim od ich polarności. Wobec tego, można powiązać retencję flawonoidów z wartością ich $\log P$, będącego miarą ich polarności. Im mniejsza wartość $\log P$ tym większa polarność danego związku. Zbadano zależność $\log k$ od $\log P$ badanych flawonoidów na wszystkich czterech stosowanych kolumnach stosując zarówno metanol jak i acetonitryl. W przypadku kolumny silikażelowej oraz diolowej nie zauważono jakiegokolwiek korelacji dla tej zależności, gdy składnikiem fazy ruchomej był metanol (rys. 53). Obydwa współczynniki korelacji były wyjątkowo małe (dla kolumny silikażelowej $R^2 = 0,080$, dla diolowej $R^2 = 0,019$). W tych warunkach dominującym mechanizmem retencji więc nie jest hydrofilowy podział. Współczynniki korelacji wyznaczone dla acetonitrylu jako składnika eluentu są znacznie wyższe, odpowiednio 0,771 i 0,632 (rys. 53).



ACN: Kolumna Atlantis HILIC

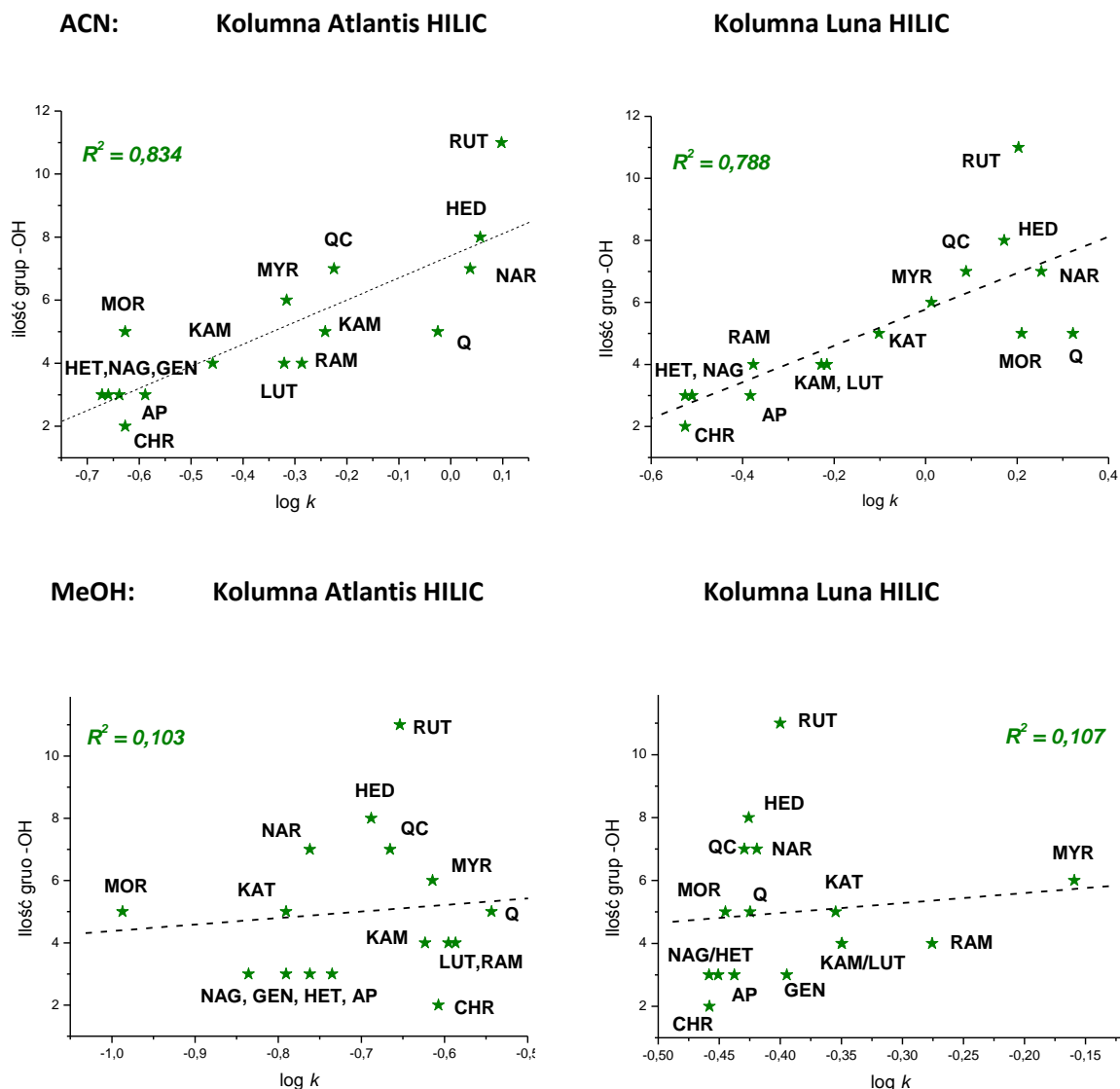


Kolumna Luna HILIC



Rys. 53. Zależność $\log k$ od $\log P$ dla badanych flawonoidów. Kolumna Atlantis HILIC Silica lub Luna HILIC, eluent: 95% ACN lub MeOH/woda.

Sprawdzono również zależność $\log k$ od ilości grup hydroksylowych w cząsteczce analitów. Wysoki współczynnik korelacji dla tej zależności sugeruje znaczny udział adsorpcji w mechanizmie rozdzielania. W przypadku zastosowania metanolu również nie otrzymano jakiegokolwiek korelacji. Jednak, gdy składnikiem fazy ruchomej jest acetonitryl, współczynniki determinacji dla obydwu kolumn są znacznie wyższe, niż dla zależności opisującej podział (rys. 54). Można zatem przypuszczać, że retencja flawonoidów na kolumnie diolowej oraz silikażelowej jest w dużym stopniu zależna od oddziaływań analitów bezpośrednio z powierzchnią fazy stacjonarnej kolumny. W przypadku kolumny silikażelowej są to oddziaływania z grupami silanolowymi. W przypadku kolumny diolowej, dodatkowo pojawia się możliwość oddziaływania analitów z grupami hydroksylowymi, będącymi modyfikacją krzemionki. Trudno jest jednak jednoznacznie określić mechanizm rozdzielania na obydwu kolumnach, gdy składnikiem eluentu jest metanol, ponieważ dla obydwu zależności nie obserwuje się jakiegokolwiek korelacji (rys. 54).



Rys. 54. Zależność $\log k$ od liczby grup -OH dla badanych flawonoidów. Kolumna Atlantis HILIC Silica lub Luna HILIC eluent: 95% ACN lub MeOH/woda.

W celu dokładniejszego zdefiniowania mechanizmu retencji flawonoidów na obydwu fazach stacjonarnych, przeanalizowano udział podziału i adsorpcji do mechanizmu retencji poszczególnych flawonoidów wg. równań (1) oraz (2) (str. 21). Współczynniki determinacji odpowiednich zależności przedstawiono w tabelach 26 i 27. W przypadku zastosowania kolumny krzemionkowej i eluentu zawierającego 95% ACN i kwas mrówkowy (pH 2,8) otrzymano większe dopasowanie do modelu podziałowego. Jednak wraz ze wzrostem pH

elucentu obserwowany jest spadek tego dopasowania i wzrost wartości współczynników determinacji dla modelu adsorpcyjnego (tabela 26). W niskim pH flawonoidy występują w formie niezdysocjowanej, przez co nie oddziałują elektrostatycznie z grupami silanolowymi, a preferowanym mechanizmem retencji jest ich podział. Ze wzrostem pH, a tym samym postępującą dysocjacją flawonoidów, właśnie oddziaływania elektrostatyczne zaczynają decydować o retencji analitów.

W przypadku metanolu nie obserwujemy takiej różnicy w wartościach współczynników determinacji w analizowanym zakresie pH. Metanol, ze względu na swoje podobieństwo do wody oraz zdolność do tworzenia wiązań wodorowych, może oddziaływać również z grupami silanolowymi a tym samym uniemożliwiać takie oddziaływania analitom. Ta jego cecha powoduje, że może on tworzyć znacznie grubsze warstwy wodne na powierzchni fazy stacjonarnej niż acetonitryl [179]. Zatem dostęp analitów bezpośrednio do złoża jest znacznie utrudniony. Sytuacja taka powoduje większe prawdopodobieństwo wystąpienia hydrofilowego podziału, nawet gdy analit mógłby w inny sposób oddziaływać ze złożem.

Podobną analizę przeprowadzono dla kolumny diolowej (tabela 27). Dla wszystkich analizowanych związków uzyskano wyższe współczynniki dopasowania dla modelu podziałowego (w nielicznych przypadkach wartości współczynników retencji dla podziału i adsorpcji były zbliżone). Potwierdza to przypuszczenie, że podział analitu ma duży wpływ na retencję flawonoidów na kolumnie diolowej. Wydaje się jednak, że w przypadku metanolu jest to główny mechanizm retencji, podczas gdy w acetonitrylu należy wziąć pod uwagę adsorpcję analitu bezpośrednio na złożu oraz oddziaływania elektrostatyczne i wiązania wodorowe między analitem a fazą stacjonarną.

Tabela 26. Współczynniki determinacji dopasowania do modelu podziałowego i adsorpcyjnego na kolumnie Atlantis HILIC.

	CHR	AP	KAM	LUT	RAM	MYR	GEN	KAT	RUT	NAG	NAR	MOR	QC	Q	HED	HET
ACN/pH 2.8																
podział ¹	0,968	0,931	0,959	0,983	0,960	0,957	0,963	0,979	0,946	0,961	0,971	0,938	0,830	0,991	0,948	0,964
adsorpcja ²	0,884	0,824	0,906	0,900	0,809	0,931	0,936	0,909	0,832	0,937	0,845	0,931	0,809	0,786	0,952	0,934
ACN/pH 7.0																
podział	0,960	0,878	0,336	0,970	0,575	0,965	0,982	0,953	0,957	0,979	0,981	0,302	0,967	0,829	0,916	0,970
adsorpcja	0,773	0,863	0,210	0,836	0,563	0,843	0,867	0,862	0,749	0,873	0,877	0,225	0,863	0,787	0,920	0,891
MeOH/pH 2.8																
podział	0,910	0,863	0,946	0,961	0,801	0,944	0,971	0,953	0,993	0,991	0,949	0,613	0,942	0,538	0,843	0,908
adsorpcja	0,858	0,607	0,649	0,970	0,697	0,902	0,719	0,776	1,00	0,809	0,755	0,046	0,759	0,041	0,930	0,882
MeOH/pH 7.0																
podział	0,843	0,321	0,735	0,986	0,948	0,634	0,923	0,952	0,935	0,949	0,942	0,965	0,972	0,009	0,958	0,996
adsorpcja	0,844	0,312	0,214	0,775	0,578	0,655	0,837	0,837	0,879	0,580	0,935	0,630	0,803	0,580	0,905	0,809

^{1/}wg. równania $\log k = \log k_0 - S \varphi_{H_2O}$; ^{2/}wg. równania $\log k = \log k_0 - m \log \varphi$

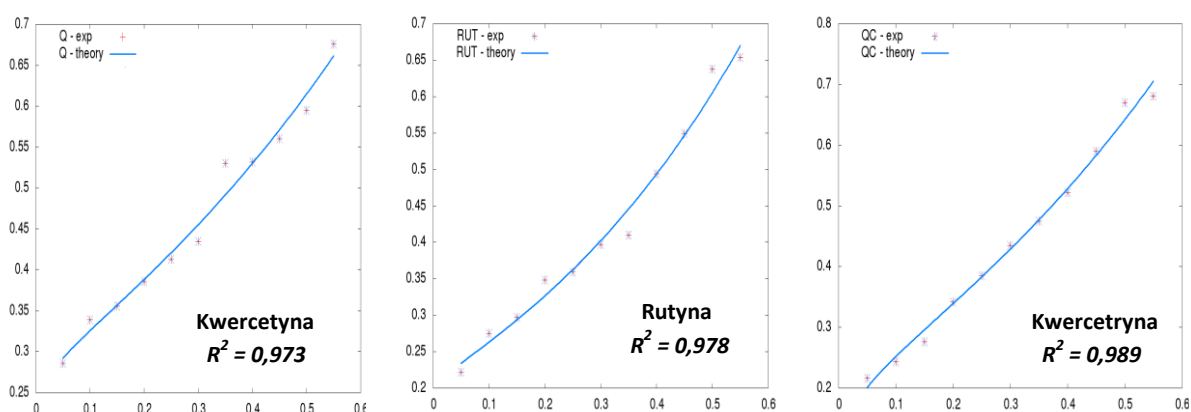
Tabela 27. Współczynniki determinacji dopasowania do modelu podziałowego i adsorpcyjnego na kolumnie Luna HILIC.

	CHR	AP	KAM	LUT	RAM	MYR	GEN	KAT	RUT	NAG	NAR	MOR	QC	Q	HED	HET
ACN/pH 2.8																
podział ¹	0,968	0,931	0,959	0,983	0,960	0,957	0,963	0,979	0,946	0,961	0,971	0,938	0,830	0,991	0,948	0,964
adsorpcja ²	0,884	0,824	0,906	0,900	0,809	0,931	0,936	0,909	0,832	0,937	0,845	0,931	0,809	0,786	0,952	0,934
ACN/pH 7.0																
podział	0,960	0,878	0,336	0,970	0,575	0,965	0,982	0,953	0,957	0,979	0,981	0,302	0,967	0,829	0,916	0,970
adsorpcja	0,773	0,863	0,210	0,836	0,563	0,843	0,867	0,862	0,749	0,873	0,877	0,225	0,863	0,787	0,920	0,891
MeOH/pH 2.8																
podział	0,910	0,863	0,946	0,961	0,801	0,944	0,971	0,953	0,993	0,991	0,949	0,613	0,942	0,538	0,843	0,908
adsorpcja	0,858	0,607	0,649	0,970	0,697	0,902	0,719	0,776	1.00	0,809	0,755	0,046	0,759	0,041	0,930	0,882
MeOH/pH 7.0																
podział	0,843	0,321	0,735	0,986	0,948	0,634	0,923	0,952	0,935	0,949	0,942	0,965	0,972	0,009	0,958	0,996
adsorpcja	0,844	0,312	0,214	0,775	0,578	0,655	0,837	0,837	0,879	0,580	0,935	0,630	0,803	0,580	0,905	0,809

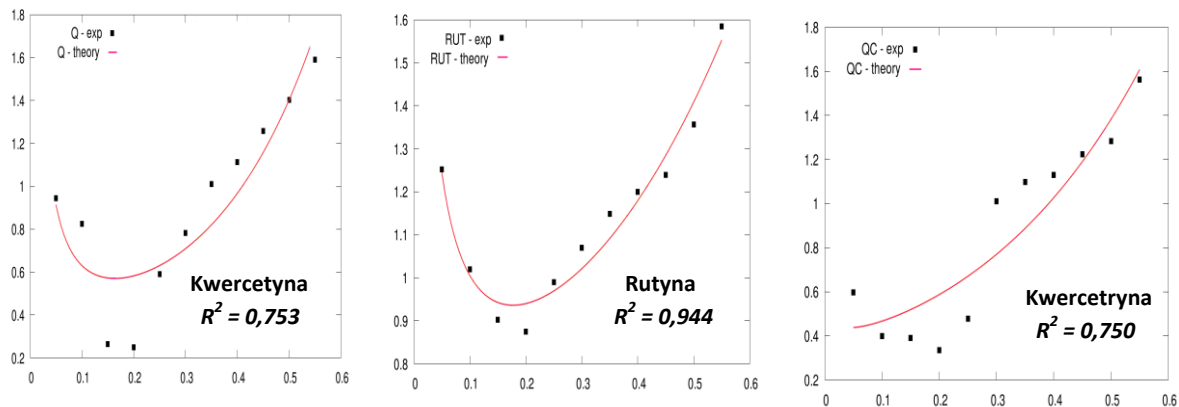
¹ wg równania $\log k = \log k_0 - S \varphi_{H_2O}$; ² wg. równania $\log k = \log k_0 - m \log \varphi$

Dopasowanie danych eksperymentalnych uzyskanych dla kolumny krzemionkowej oraz diolowej do modeli matematycznych opisujących zarówno mechanizm podziałowy, jak i adsorpcyjny, nie przyniosło jednoznacznej odpowiedzi. Zdecydowano więc sprawdzić zależność wyrażoną równaniem (3) $\ln k = a + b\varphi_{H_2O} + c \ln \varphi_{H_2O}$, która zakłada addytywność obu mechanizmów [56]. Przykładowe dane graficzne dla kwercetyny oraz jej glikozydów dla metanolu i acetonitrylu jako składników fazy ruchomej przedstawiono na rysunku 55 dla kolumny silikażelowej oraz na rysunku 56 dla kolumny diolowej.

MeOH/H₂O (95:5)

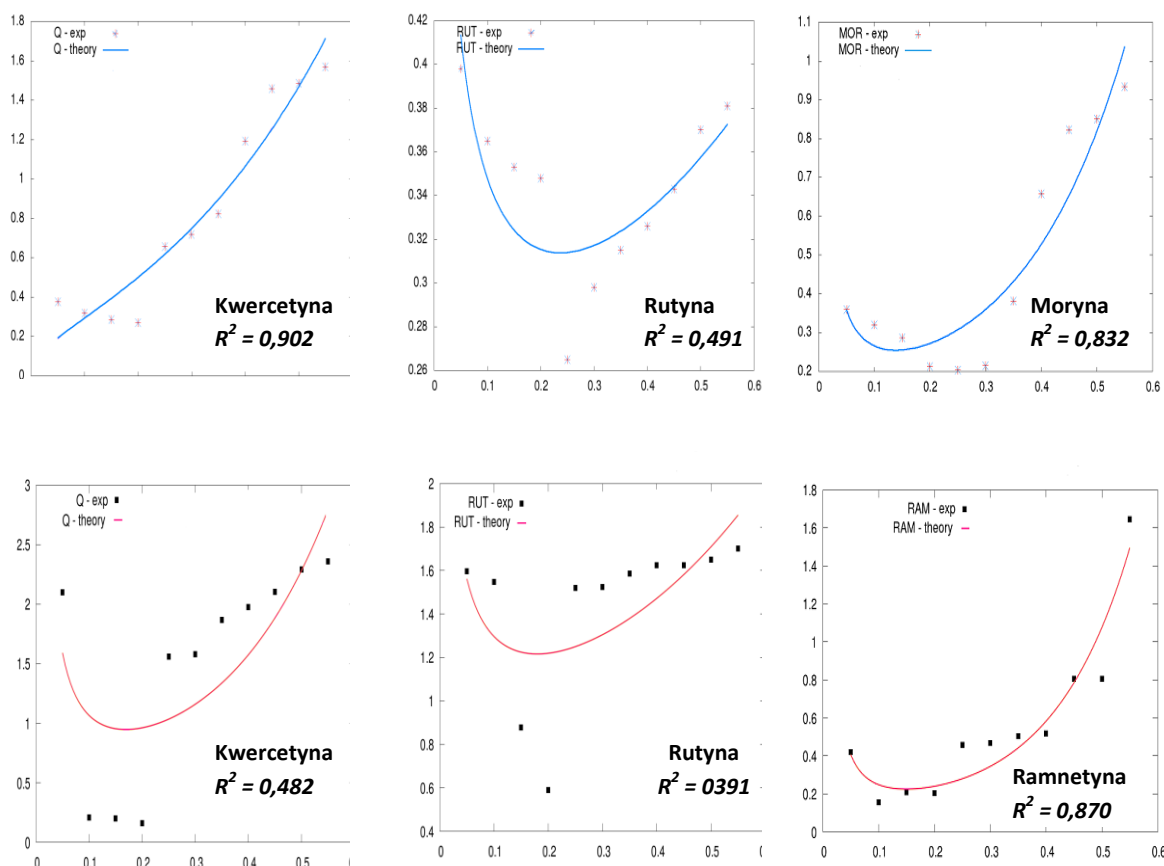


ACN/H₂O (95:5)



Rys. 55. Wykresy zależności $\ln k = a + b\varphi_{H_2O} + c \ln \varphi_{H_2O}$ dla kwercetyny i jej glikozydów dla kolumny silikażelowej.

MeOH/H₂O (95:5)



Rys. 56. Wykresy zależności $\ln k = a + b\phi_{H_2O} + c \ln \phi_{H_2O}$ dla flawonoidów dla kolumny diolowej.

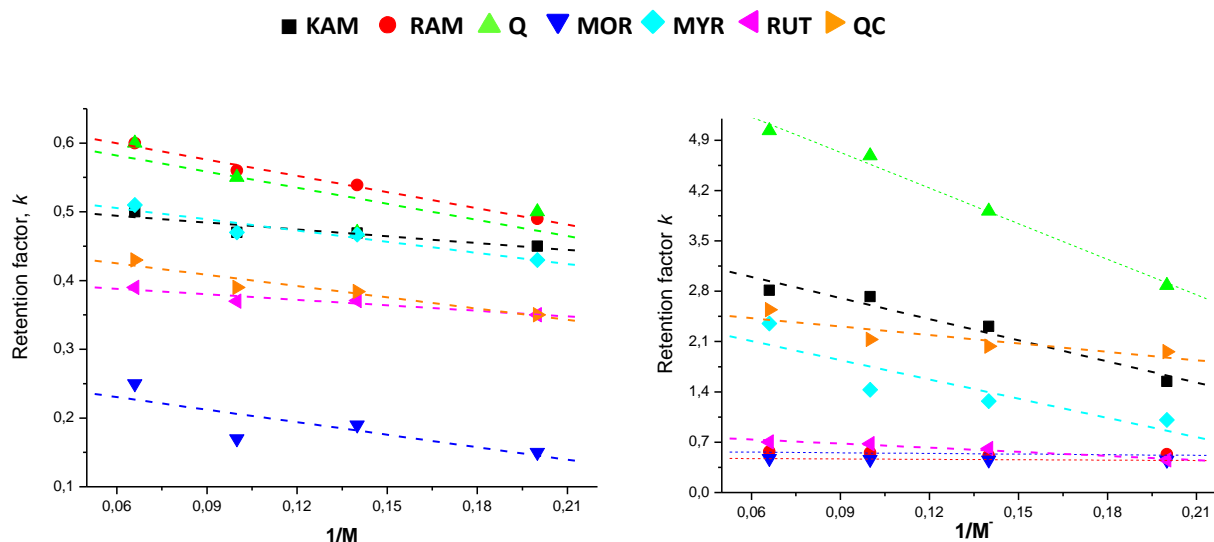
Współczynniki determinacji dla badanej zależności mieszanego mechanizmu retencji flawonoidów dla kolumny silikażelowej przy użyciu metanolu były stosunkowo dobre (0,94-0,99), ale dla acetonitrylu znacznie niższe (0,75-0,98). Natomiast dla kolumny diolowej, zwłaszcza przy zastosowaniu acetonitrylu jako składnika fazy ruchomej, wyniki eksperymentalne są rozbieżne z danymi uzyskanymi z obliczeń. Dane literaturowe wskazują, że dla niektórych grup związków uzyskiwana jest dobra zgodność zależności pomiędzy retencją chromatograficzną a zawartością modyfikatora w fazie ruchomej według równania 3 [56,59,], ale także stwierdzono duże rozbieżności [39,66].

Pomiędzy fazą stacjonarną a analitami i składnikami fazy ruchomej możliwe są także oddziaływania na zasadzie wymiany jonowej. Zbadano zależność współczynnika retencji dla badanych analitów od odwrotności stężenia soli w eluencie (równanie 6, str. 30). Graficzna ilustracja tych zależności jest przedstawiona na rysunku 57. Dla kolumny silikażelowej

otrzymano w miarę prostoliniowe przebiegi krzywych dla tej zależności ze współczynnikami determinacji w zakresie 0,837-0,999 (dla ACN) oraz 0,819-0,993 (dla MeOH). Dla kolumny diolowej współczynniki determinacji dla regresji liniowej wynosiły 0,512-0,974 (dla MeOH). Jednak graficzne zależności k vs. $1/C$ oraz $\log k$ vs. $\log C$ nie spełniały w pełni warunków mechanizmu wymiany jonowej [39,66], gdyż nachylenia krzywych postaci logarytmicznej badanej zależności są znacznie mniejsze od jedności. Potwierdza to wcześniejsze wnioski o przewadze mechanizmu podziału w retencji analitów nad adsorpcją związaną z oddziaływaniami elektrostatycznymi. Genaralnie, mechanizm retencji w chromatografii HILIC zależy od bardzo wielu czynników i należy traktować go wielowymiarowo.

Kolumna silikażelowa Atlantis

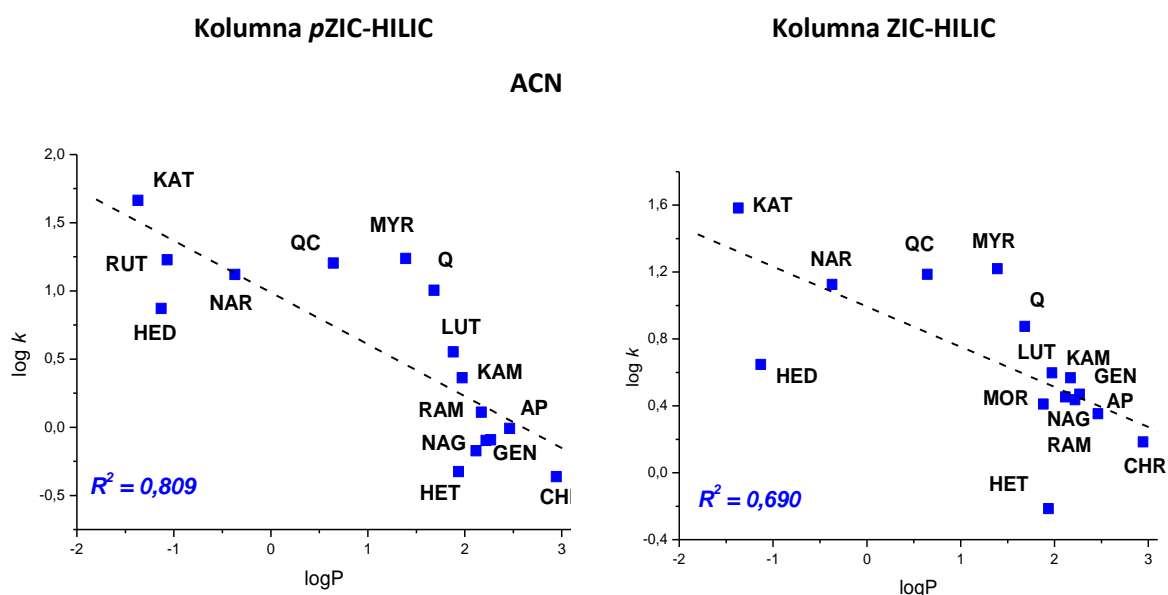
Kolumna diolowa Luna

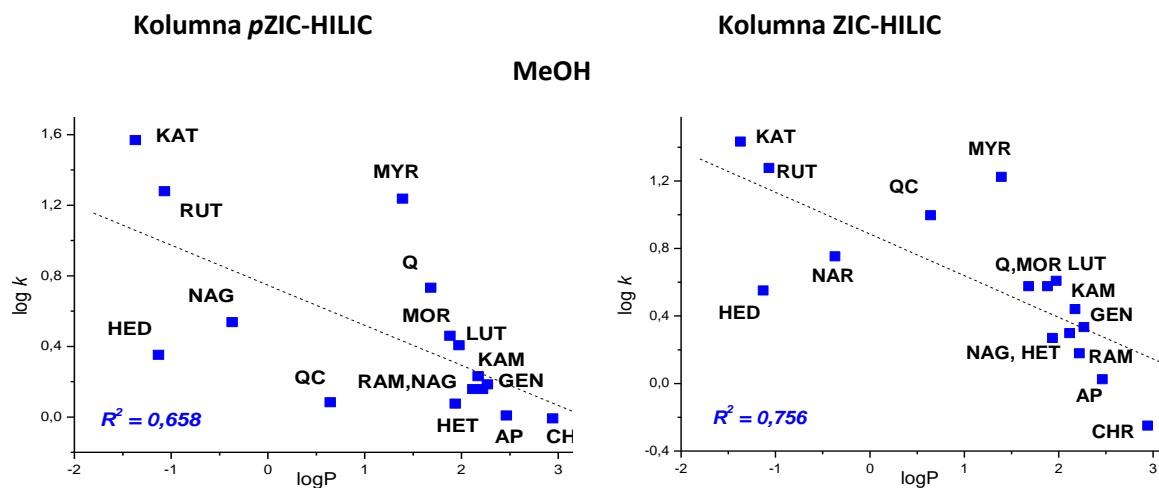


Rys. 57 Przebiegi zależności opisujących mechanizm oparty na wymianie jonowej dla grupy flawonoli na kolumnie (A) silikażelowej, (B) diolowej. Eluent: 95% MeOH/octan amonu.

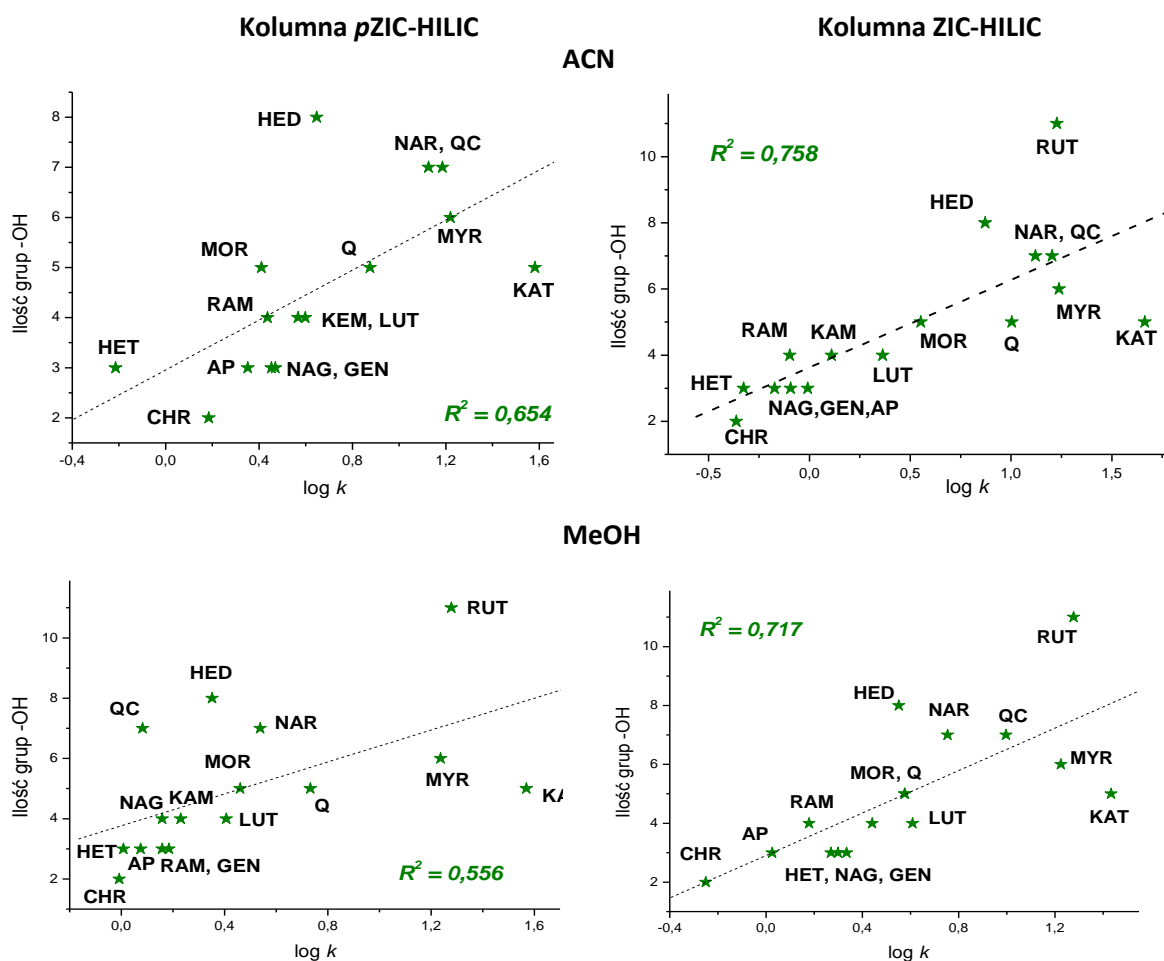
7.2. Kolumny sulfobetainowe ZIC

Analogiczne rozważania dotyczące dominującego mechanizmu retencji przeprowadzono dla kolumn sulfobetainowych (ZIC-HILIC i *p*ZIC-HILIC). Pomimo tego, iż obydwie kolumny różnią się jedynie podłożem modyfikacji, zaobserwowano znaczące różnice we współczynnikach determinacji do modelu podziałowego i adsorpcyjnego dla obydwu kolumn. W przypadku kolumny o podłożu polimerycznym wyeliminowane zostały ewentualne oddziaływania z grupami silanolowymi, pochodzącymi z podłoża modyfikacji. Dla tej kolumny wyższe współczynniki korelacji w modelu podziałowym (zależność $\log k$ vs. $\log P$) zaobserwowano, gdy jako składnika eluentu użyto acetonitrylu (rys. 58). Współczynniki determinacji mają zróżnicowane wartości (odpowiednio 0,809 dla podziału i 0,654 dla adsorpcji), co sugeruje, że obydwa rozważane mechanizmy nie jednakowo wpływają na ogólny mechanizm rozdzielania (rys. 59). Znacznie niższe współczynniki determinacji otrzymano dla analogicznych zależności, gdy zastosowano metanol jako składnik eluentu (0,658 dla podziału i 0,556 dla adsorpcji). Duże odchylenia od jedności sugerują, że mechanizm retencji jest mieszany i zarówno podział, jak i adsorpcja mają wpływ na retencję flawonoidów. W przypadku kolumny ZIC-HILIC możliwe są dodatkowe oddziaływania z grupami silanolowymi pochodzącymi z podłoża modyfikacji kolumny. Zarówno w przypadku zastosowania metanolu jak i acetonitrylu otrzymano zbliżone wartości współczynników korelacji. Jedynie nieznacznie wyższe były współczynniki dopasowania do modelu podziałowego. Sugeruje to także występowanie mieszanego mechanizmu retencji.





Rys. 58. Zależność logP od logk dla badanych flawonoidów. Kolumna pZIC-HILIC i ZIC-HILIC; eluent: 95% ACN lub MeOH/woda.



Rys. 59. Zależność logk od liczby grup -OH dla flawonoidów. Kolumna ZIC-HILIC oraz pZIC-HILIC eluent: 95% ACN lub MeOH/woda.

Dla obydwu kolumn przeanalizowano współczynniki dopasowania dla pojedynczych flawonoidów do modelu podziałowego i adsorpcyjnego. W przypadku kolumny *p*ZIC-HILIC pomiary przeprowadzono również w pH 9. W przypadku sulfobetainowej fazy stacjonarnej o polimerycznej matrycy modyfikacji wyniki w całym zakresie pH były zbliżone (tabela 28). W przypadku obydwu modeli otrzymano wysokie współczynniki retencji. Z reguły nieco wyższe wartości współczynników korelacji otrzymuje się w przypadku zastosowania acetonitrylu jako składnika fazy ruchomej (wyjątek chryzyna, kwercetyna i hesperetyna w metanolu). Oznacza to, że w przypadku zastosowania acetonitrylu, anality ulegają hydrofilowemu podziałowi i to on jest odpowiedzialny za ich retencję. Nieznaczne odchylenia od jedności można utożsamiać z nieznacznym wpływem innych oddziaływań (np. wiązań wodorowych, oddziaływań dipol-dipol na retencję). Wyjątek od tej reguły stanowi chryzyna, dla której współczynnik korelacji z modelem adsorpcyjnym wynosi 1. Jednocześnie dopasowanie do modelu podziałowego jest większe niż 0,95. W przypadku takich analitów trudno jest jednoznacznie rozstrzygać o mechanizmie retencji. Sumarycznie dla obydwu badanych rozpuszczalników współczynniki korelacji są wysokie, jednak znacznie odbiegające od 1. Należy zatem przyjąć, że mechanizm retencji jest złożony i składają się na niego zarówno podział, jak i adsorpcja, związana z tworzeniem wiązań wodorowych i oddziaływaniami elektrostatycznymi.

Analogiczne wnioski wyciągnięto dla kolumny ZIC-HILIC (tabela 29). Dla większości analizowanych substancji to hydrofilowy podział jest decydującym mechanizmem rozdzielania, jednak różnice w wartościach współczynników dopasowania w większości przypadków są niewielkie. Najrozsądniej byłoby zatem przyjąć, że mechanizm rozdzielania z zastosowaniem kolumny ZIC-HILIC ma charakter złożony, a hydrofilowy podział jak i adsorpcja są bardzo ważnymi jego składowymi. To, który z nich przeważa, ściśle zależy od danego flawonoidu, co przekłada się na średnie wartości współczynników korelacji dla zależności określających całą badaną grupę.

Tabela 28 Współczynniki determinacji dopasowania do modelu podziałowego i adsorpcyjnego na kolumnie *p*ZIC-HILIC.

	CHR	AP	KEM	LUT	RAM	MIR	GEN	KAT	RUT	NAG	NAR	MOR	QC	Q	HED	HET
ACN, pH 2,8																
podział ¹	0,9849	0,9425	0,8937	0,8988	0,9662	0,7456	0,9647	0,8135	0,8998	0,9641	0,8537	0,8077	0,8652	0,9121	0,8636	0,9541
adsorpcja ²	0,9667	0,8759	0,7764	0,7865	0,9262	0,5066	0,9229	0,6242	0,7884	0,9216	0,6986	0,6138	0,7206	0,8133	0,7176	0,9003
ACN, pH 7,0																
podział	0,8637	0,9472	0,8739	0,7861	0,9527	0,8759	0,9498	0,9142	0,9768	0,9285	0,8687	0,9211	0,8088	0,7875	0,8775	0,9014
adsorpcja	0,7178	0,9426	0,6223	0,4693	0,7673	0,6171	0,7401	0,6824	0,9493	0,8473	0,7018	0,8313	0,6155	0,5782	0,7456	0,7778
ACN, pH 9,0																
podział	0,9596	0,9234	0,7964	0,7955	0,9186	0,7907	0,9437	0,8317	0,9382	0,8886	0,8460	0,8560	0,9304	0,9881	0,8238	0,8877
adsorpcja	0,9119	0,8364	0,5936	0,5921	0,8266	0,5986	0,8784	0,6575	0,8670	0,7663	0,6842	0,7030	0,8507	0,9737	0,6429	0,7465
MeOH, pH 2,8																
podział	0,9925	0,9713	0,9755	0,9655	0,9152	0,9525	0,9741	0,9516	0,9155	0,9608	0,9444	0,9377	0,8907	0,9196	0,8948	0,9714
adsorpcja	0,9833	0,9410	0,9463	0,9333	0,8195	0,8969	0,9431	0,8949	0,8201	0,9145	0,8798	0,8658	0,7705	0,8285	0,7784	0,9373
MeOH, pH 7,0																
podział	0,9591	0,9974	0,9396	0,8659	0,9464	0,9658	0,9114	0,9259	0,9768	0,9285	0,8687	0,9211	0,8088	0,7875	0,8775	0,9014
adsorpcja	1,000	0,9424	0,7578	0,6053	0,8218	0,8304	0,7262	0,7612	0,5710	0,8079	0,8510	0,8608	0,7506	0,9086	0,8236	0,9151
MeOH, pH 9,0																
podział	0,9659	0,9629	0,9720	0,9745	0,9499	0,9204	0,9251	0,9868	0,9602	0,9645	0,9620	0,9890	0,9421	0,9699	0,9046	0,9917
adsorpcja	0,9254	0,9192	0,9387	0,9440	0,8914	0,8302	0,8602	0,9711	0,7360	0,9225	0,9173	0,9758	0,8750	0,9342	0,7981	0,9816

¹ wg równania $\log k = \log k_0 - S \varphi_{H_2O}$; ² wg. równania $\log k = \log k_0 - m \log \varphi$

Tabela 29. Współczynniki determinacji dopasowania do modelu podziałowego i adsorpcyjnego na kolumnie ZIC-HILIC.

	CHR	AP	KAM	LUT	RAM	MYR	GEN	KAT	RUT	NAG	NAR	MOR	QC	Q	HED	HET
ACN/pH 2,8																
podział ¹	0,7046	0,5616	0,8590	0,8990	0,5995	0,9202	0,6073	0,9161	0,8453	0,7384	0,8826	0,6911	0,8775	0,8156	0,9574	0,5803
adsorpcja ²	0,4343	0,2912	0,6230	0,8017	0,3182	0,8441	0,3452	0,8926	0,9392	0,4619	0,7555	0,4645	0,7133	0,665	0,8762	0,3570
ACN/pH 7,0																
podział	0,5091	0,9673	0,7256	0,8982	0,8685	0,7100	0,9715	0,7289	0,9979	0,3927	0,6019	0,6916	0,733	0,9834	0,9785	0,9785
adsorpcja	0,6665	0,8942	0,4113	0,9635	0,3835	0,9376	0,9959	0,8928	0,9770	0,5448	0,8652	0,8762	0,8356	0,9462	0,9752	0,9154
MeOH/pH 2,8																
podział	0,9312	0,8901	0,9483	0,9390	0,9433	0,8052	0,9613	0,8609	0,7250	0,8619	0,8235	0,8548	0,8398	0,8599	0,7991	0,9503
adsorpcja	0,7234	0,8186	0,7401	0,7314	0,7160	0,9432	0,8327	0,9787	0,9476	0,9551	0,9343	0,6134	0,9614	0,6830	0,9025	0,9807
MeOH/pH 7,0																
podział	0,7749	0,9550	0,8935	0,8578	0,8692	0,8404	0,9253	0,8682	0,8589	0,9453	0,8410	0,9437	0,9483	0,8485	0,8677	0,9525
adsorpcja	0,8717	0,2961	0,8011	0,9708	0,8584	0,6718	0,7638	0,6822	0,6288	0,7300	0,7171	0,7992	0,9029	0,9757	0,5946	0,8175

¹ wg równania $\log k = \log k_0 - S \varphi_{H_2O}$; ² wg. równania $\log k = \log k_0 - m \log \varphi$

Polimeryczne podłoże modyfikacji złoża kolumny *p*ZIC-HILIC, pozwala na pracę w szerszym zakresie pH w porównaniu do kolumn krzemionkowych. Umożliwiło to zbadanie wpływu dysocjacji flawonoidów na ich mechanizm retencji w chromatografii HILIC. W pH 7 flawonoidy są zdysocjowane w mniejszym lub większym stopniu w zależności od ich wartości *pK*_a (tabela 12). Jednak w pH 9 są one już całkowicie zdysocjowane i wzrasta ich polarność. Można zatem przypuszczać, że w takiej formie będą się wykazywać większą retencję. Zbadano dopasowanie retencji flawonoidów do modelu podziałowego (zależność log *P* od log *k*) i adsorpcyjnego (zależność log *k* od liczby grup –OH. Współczynniki determinacji otrzymanych zależności zestawiono w tabeli 30 wraz z tymi otrzymanymi dla pH 7.

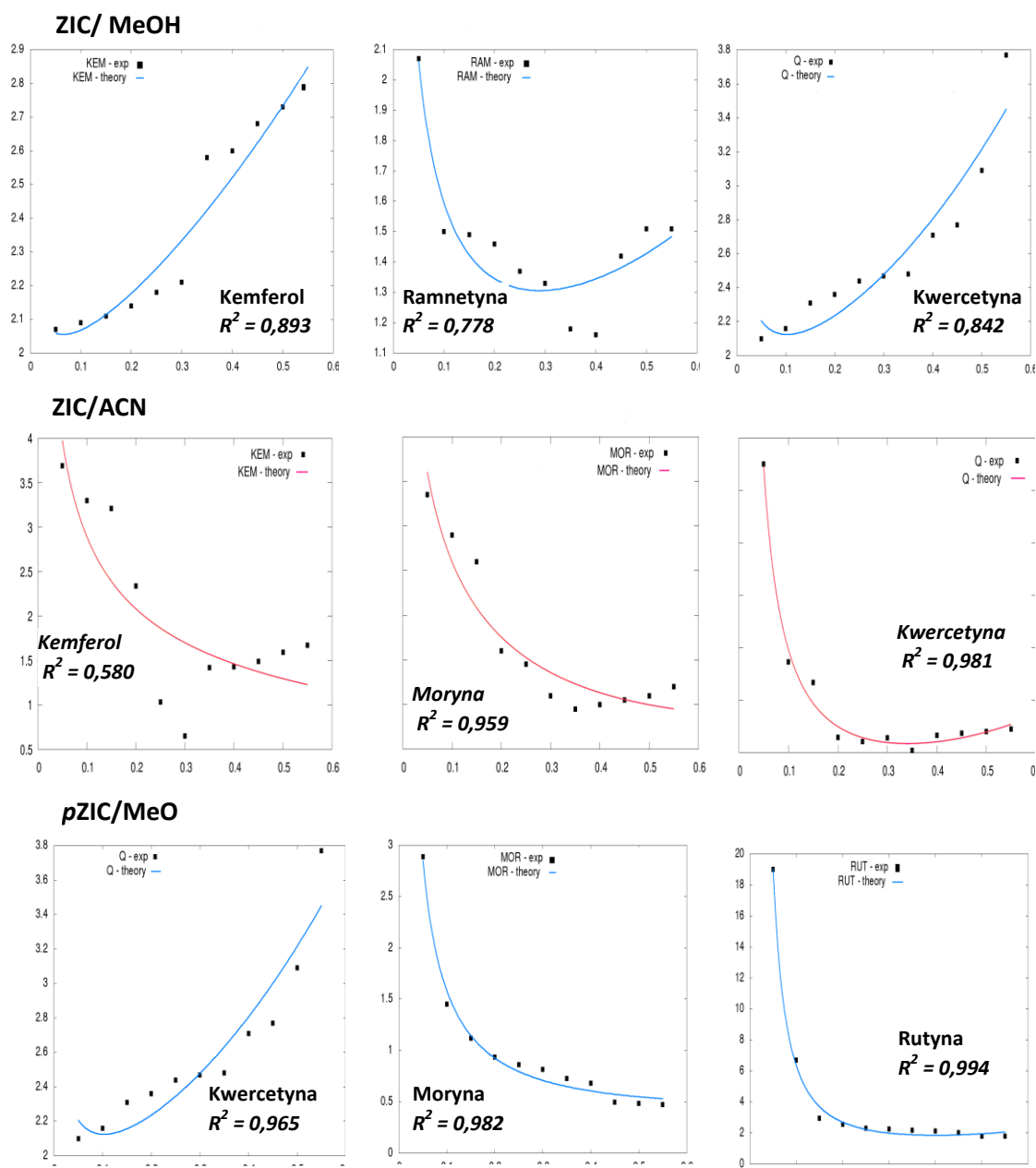
Tabela 30. Współczynniki determinacji zależności opisujących model podziałowy i adsorpcyjny. Kolumna *p*ZIC-HILIC: 95% ACN lub MeOH/octan amonu pH 7 lub 9.

	pH 7	pH 9
Model podziałowy		
ACN	0,544	0,532
MeOH	0,260	0,484
Model adsorpcyjny		
ACN	0,544	0,478
MeOH	0,260	0,390

W przypadku zastosowania acetonitrylu jako składnika fazy ruchomej, brak zdecydowanego wpływu pH fazy ruchomej na mechanizm rozdzielania flawonoidów, jedynie niewielki spadek udziału adsorpcji w ogólnym mechanizmie rozdzielania wraz ze wzrostem pH. Można to tłumaczyć elektrostatycznym odpychaniem się zdysocjowanych form flawonoidów z ujemnie naładowaną grupą sulfonową, która w sulfobetainowym ligandzie znajduje się na zewnątrz i jest łatwo dostępna dla analitów. W przypadku użycia metanolu następuje wzrost udziału hydrofilowego podziału, ale współczynnik determinacji dla modelu adsorpcyjnego rośnie wraz ze wzrostem pH. Metanol, posiadający zdolność do tworzenia wiązań wodorowych, wypiera cząsteczki wody z warstwy wodnej czyniąc ją mniej polarną. Warstwa wodna tworzona w tych warunkach jest grubsza niż ta, która formowana jest

w eluentach zawierających acetonitryl. Zatem sama grubość warstwy wodnej w eluentach zawierających metanol powinna znacznie utrudniać analitom kontakt ze złożem kolumny, a tym samym adsorpcję.

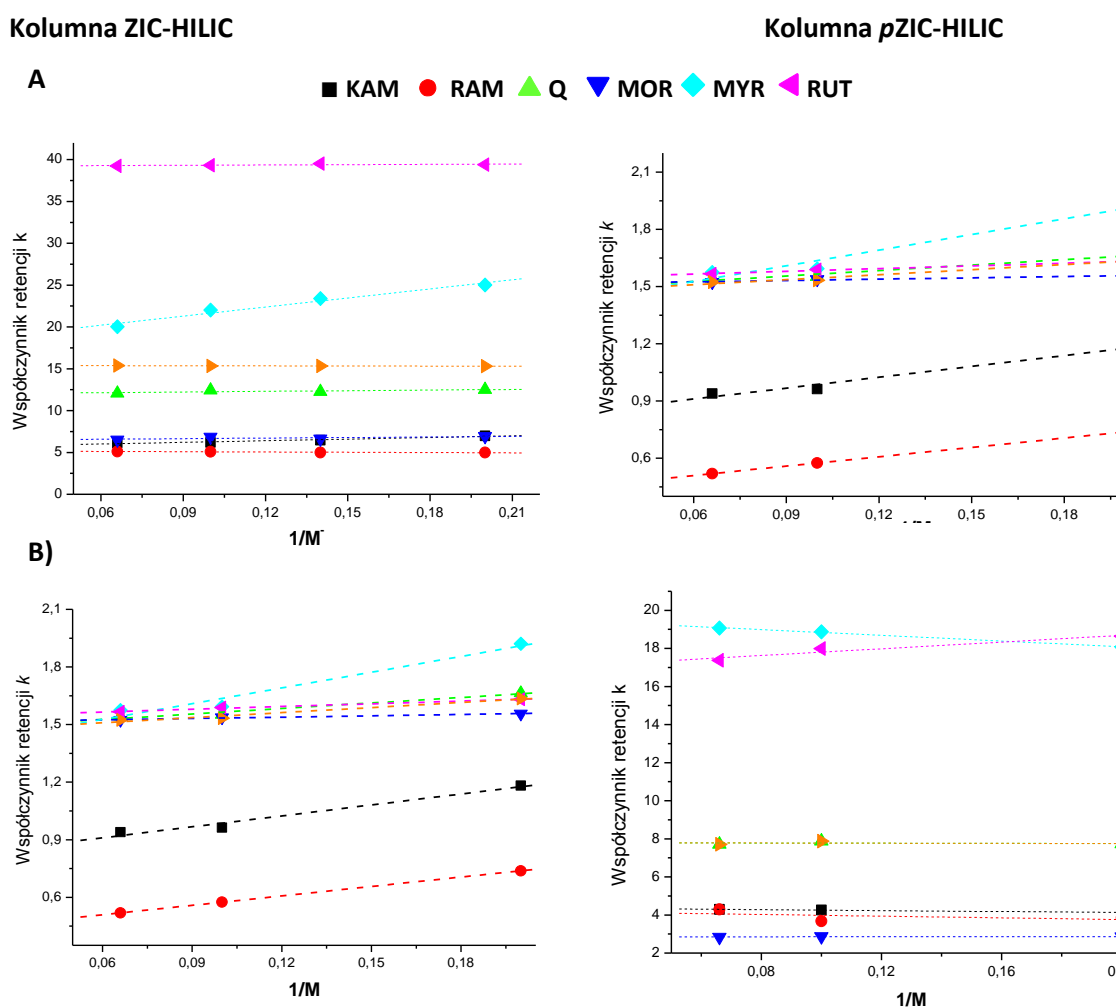
Zastosowano także model matematyczny, który uzględnia addytywność mechanizmu podziałowego i adsorpcyjnego opisanego równaniem (3) $\ln k = a + b\phi_{H_2O} + c\ln\phi_{H_2O}$. Przykładowe dane graficzne dla wybranych flawonoidów przedstawiono na rysunku 60.



Rys. 60. Wykresy zależności $\ln k = a + b\phi_{H_2O} + c\ln\phi_{H_2O}$ dla wybranych flawonoidów dla kolumn ZIC-HILIC i pZIC-HILIC.

Współczynniki determinacji dla badanej zależności mieszanego mechanizmu retencji flawonoidów dla obydwu kolumn były wysokie (0,94-0,99) dla obu stosowanych eluentów. Wyjątek stanowi kemferol, dla którego współczynnik determinacji na kolumnie ZIC-HILIC wynosi 0,580, gdy jako składnika eluentu użyto acetonitrylu.

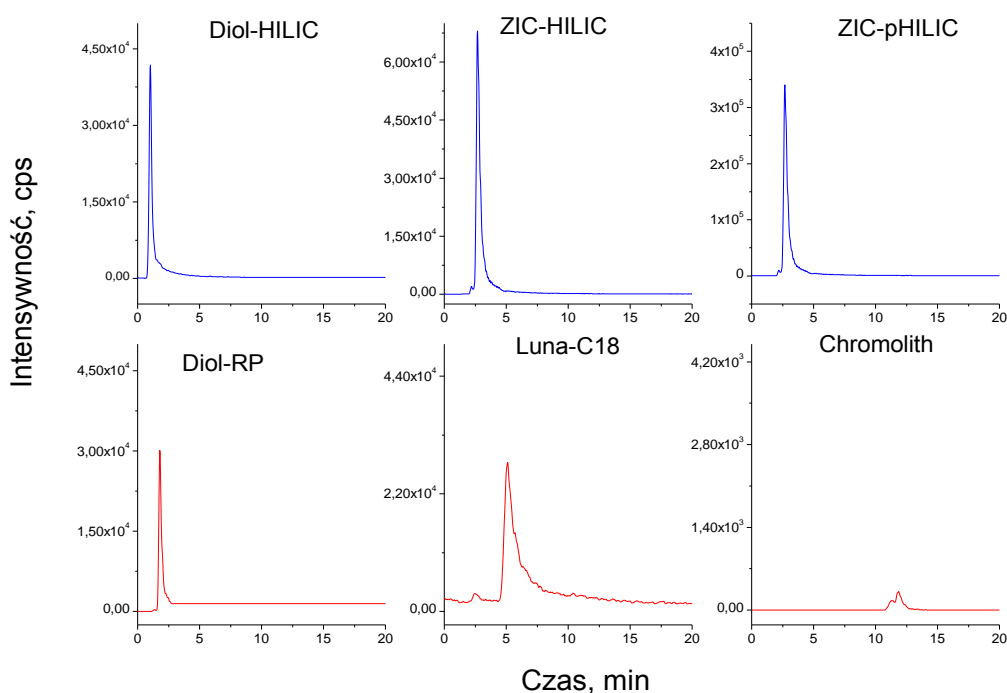
Zbadano także wpływ wymiany jonowej na mechanizm rozdzielania. Graficzna ilustracja zależności współczynnika retencji od odwrotności stężenia soli w eluencie (równanie 6, str. 30) jest przedstawiona na rysunku 61. W każdym analizowanym przypadku otrzymano prostoliniowe zależności o wysokich wartościach współczynników dopasowania ($> 0,9$ dla ACN i $> 0,8$ dla MeOH). Sugeruje to duży udział adsorpcji (i związanej z nią wymiany jonowej) w mechanizmie retencji na kolumnach sulfobetainowych.



Rys. 61. Zależności współczynników retencji dla flawonoli na kolumnie ZIC-HILIC oraz *p*ZIC-HILIC Eluent: (A) 95% MeOH/octan amonu, (B) 95% ACN/octan amonu.

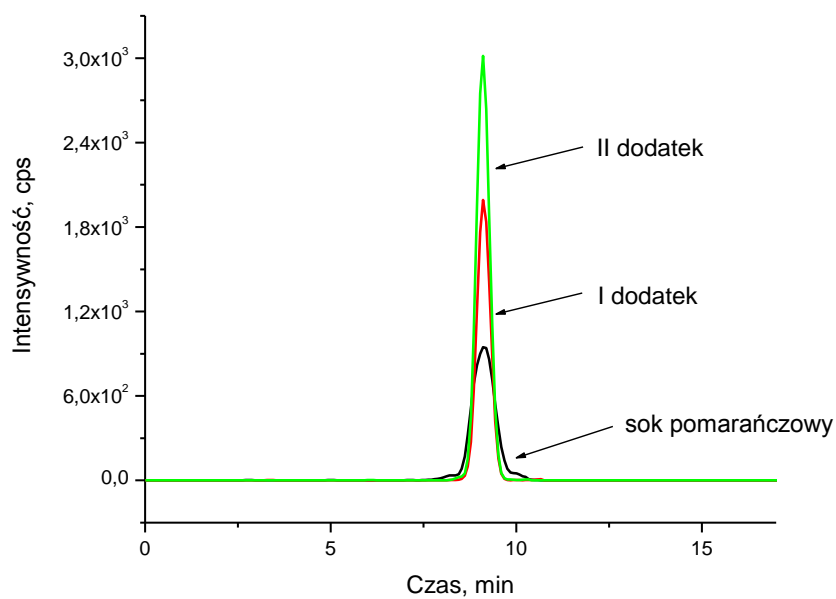
8. Zastosowanie chromatografii HILIC w analizie próbek naturalnych

Szczególny skład faz ruchomych stosowanych w chromatografii oddziaływań hydrofilowych sprawia, że technika ta jest polecana do połączenia z detekcją z zastosowaniem spektrometru mas. Duża zawartość rozpuszczalników organicznych w eluentach wspomaga jonizację analitów w źródle jonów, co zwiększa czułości detekcji. Porównano intensywność sygnałów badanych flawonoidów otrzymanych z zastosowaniem pięciu kolumn; dwie z nich (Chromolith oraz Luna C-18) są szeroko stosowane w chromatografii w układzie faz odwróconych. Pozostałe trzy (Luna HILIC, *p*ZIC-HILIC oraz ZIC-HILIC) zostały omówione w poprzednich rozdziałach niniejszej rozprawy. Kolumnę Luna HILIC użyto zarówno w trybie HILIC jak i RP. Znacząco większe intensywności sygnałów otrzymano dla kolumn pracujących w trybie HILIC. Uzyskane sygnały w trybie faz odwróconych cechowały się niższymi intensywnościami oraz większą asymetrycznością (Rys. 62). Dla kolumny Luna HILIC, która w badaniach została użyta w obydwu trybach, nie zauważono istotnego wpływu zawartości rozpuszczalnika na kształt sygnału, jednak, podobnie jak dla pozostałych kolumn, większą intensywność sygnału uzyskano pracując w trybie HILIC. Otrzymane wyniki podkreślają potencjał chromatografii oddziaływań hydrofilowych w analizie próbek naturalnych, w których anality często znajdują na bardzo niskich poziomach stężeń, a dodatkowym utrudnieniem jest skomplikowana matryca próbki.



Rys. 62. Porównanie czułości oznaczeń w trybie RP i HILIC na przykładzie luteoliny. Eluent: 95% ACN/woda tryb HILIC, 45% ACN/woda tryb RP.

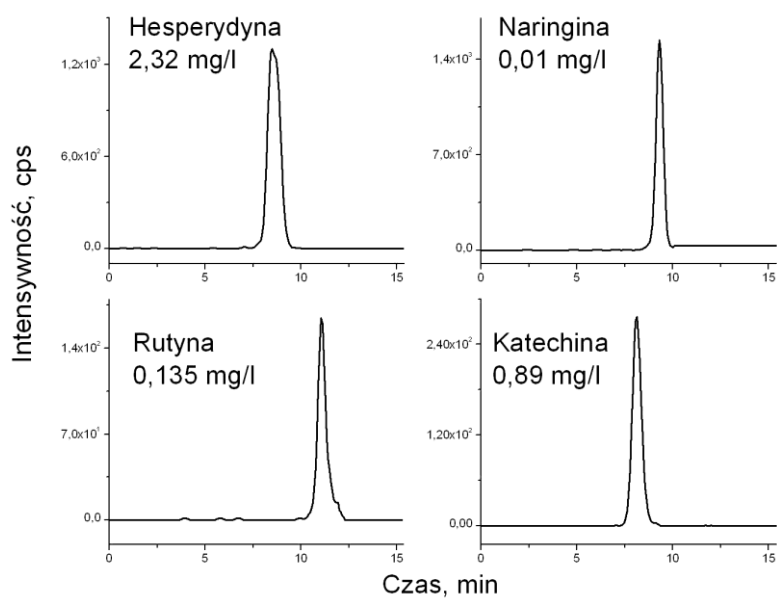
Chromatografię oddziaływań hydrofilowych sprzężoną z tandemową spektrometrią mas wykorzystano do oznaczania zawartości flawonoidów w sokach owocowych: pomarańczowym oraz z czerwonego i białego grejpfruta (z serii Tymbark 100% sok). Procedura przygotowania próbki obejmowała pobranie 5 mL soku, odparowanie rozpuszczalnika i rozpuszczenie pozostałości w 2 mL ACN. Przed analizą próbka została przesączona przez filtr 0,45 μm . Analizie poddano także odzyski poszczególnych flawonoidów w badanych sokach. W tym celu do próbki soku dodano znaną ilość każdego z wykrytych w sokach flawonoidów i próbkę przygotowano według zoptymalizowanej procedury. Dodatek wzorca przeprowadzono dwukrotnie. Przykładowy chromatogram hesperydyny w soku pomarańczowym zilustrowano na rysunku 63.



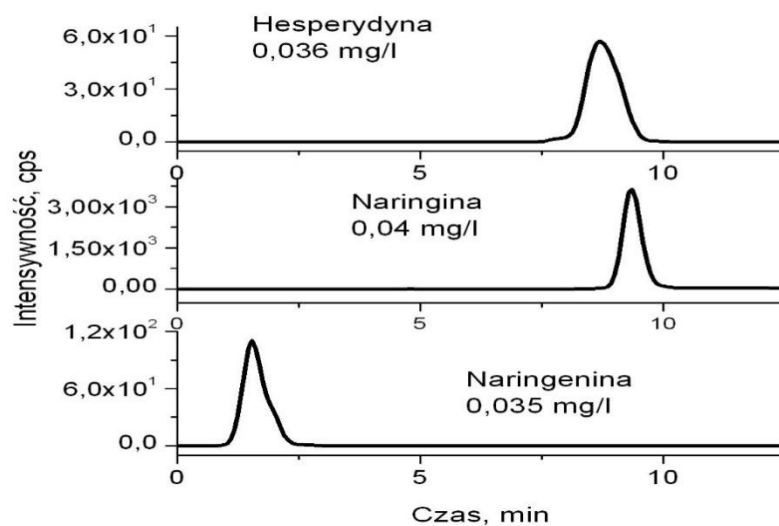
Rys 63. Odzyski uzyskane dla hesperydyny w soku pomarańczowym

Soki grejpfrutowe nie różniły się znacząco pod względem zawartości flawonoidów. Największą ich zawartość oznaczono w soku pomarańczowym. Chromatogramy soków wraz z wyznaczonymi zawartościami poszczególnych flawonoidów przedstawiono na rysunku 64.

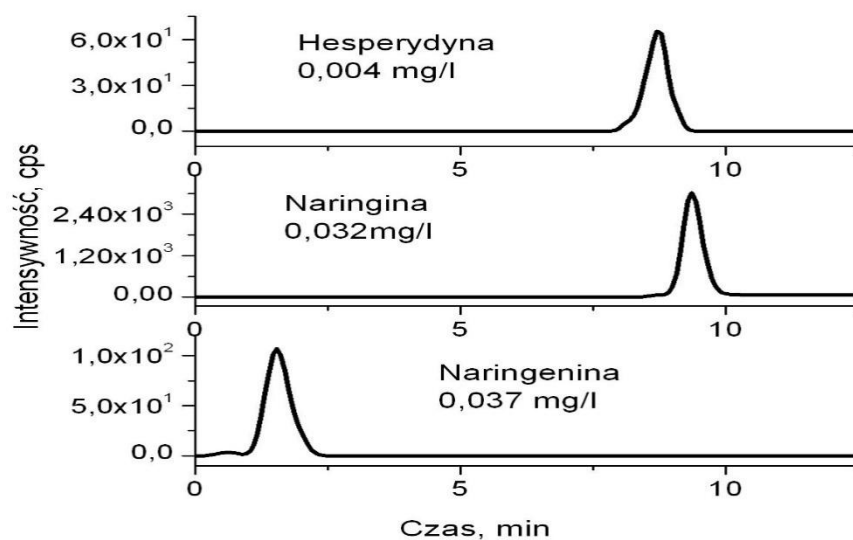
A



B



C



Rys. 64. Chromatogramy analizowanych soków owocowych: A-pomarańczowy, B- z czerwonego grejpfruta, C- z białego grejpfruta.

Chromatografię oddziaływań hydrofilowych zastosowano także w analizie naparów ziół. Przygotowano napary komercyjnie dostępnych herbat firmy Herbapol. Procedura przygotowania próbki polegała na zalaniu torebki herbaty (2g) 50 mL wrzącej wody i parzeniu przez 10 min. Analizie poddano napary dziurawca (*Hypericum perforatum*), melisy (*Melissa officinalis*) oraz rumianku (*Matricaria recutita*).

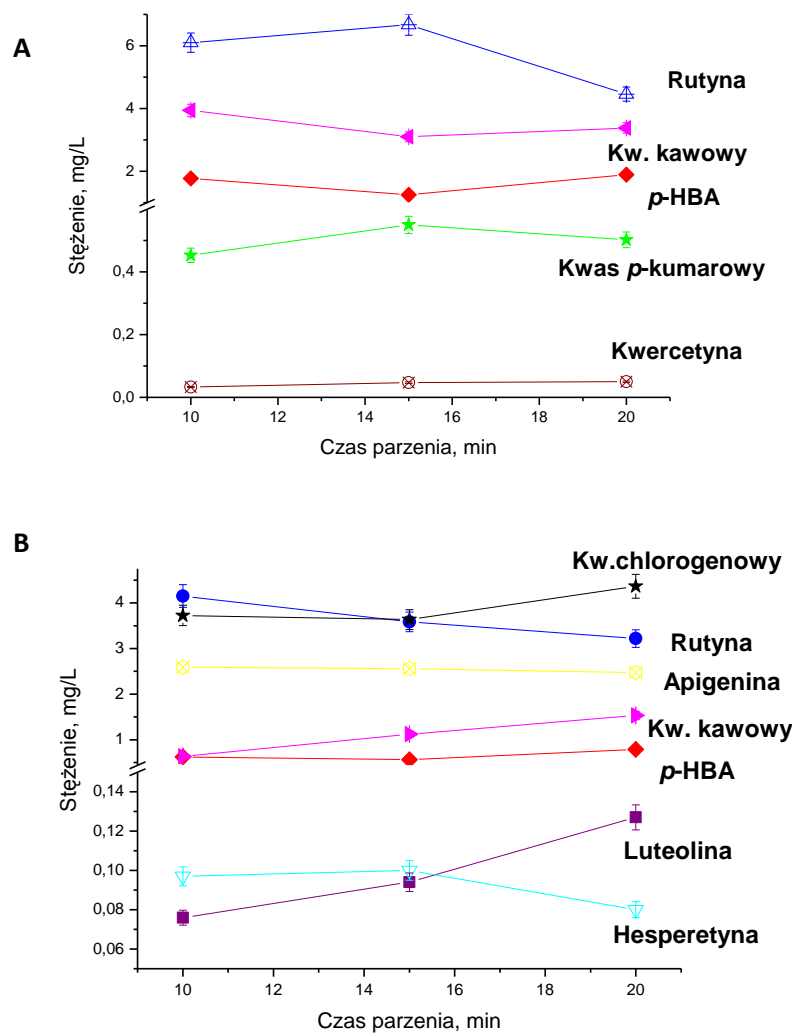
Tabela 31. Wyniki analizy ilościowej*naparów z dziurawca, melisy i rumianku.

	Stężenie związków polifenolowych w naparach ziół, mg/L		
	<i>Dziurawiec</i>	<i>Melisa</i>	<i>Rumianek</i>
Katechina	445 ± 12,1	< LOD	<LOD
Kwercetyna	0,87 ± 0,04	< LOD	< LOD
Kwercytryna	28,7 ± 1,61	0,04 ± 0,002	< LOD
Rutyna	432 ± 3,61	4,32 ± 0,21	2,44 ± 0,08
Hesperetyna	<LOD	< LOD	0,04 ± 0,002
Hesperydyna	19,1 ± 0,75	< LOD	< LOD
Luteolina	< LOD	< LOD	0,07 ± 0,02
Mirycetyna	< LOD	0,37 ± 0,02	< LOD
Apigenina	<LOD	< LOD	2,60 ± 0,19
Kwas galusowy	2,89 ± 0,13	0,37 ± 0,03	0,02 ± 0,001
Kwas kawowy	1,13 ± 0,06	9,38 ± 0,41	0,40 ± 0,04
Kwas <i>p</i> -kumarowy	0,57 ± 0,03	0,37 ± 0,03	0,04 ± 0,003
Kwas chlorogenowy	204 ± 5,7	0,21 ± 0,02	0,11 ± 0,02
Kwas <i>p</i> -HBA	< LOD	1,59 ± 0,08	0,41 ± 0,03
Kwas rozmarynowy	< LOD	70,0 ± 0,87	< LOD

*Program gradientu: 0-4 min 98% B, 6-7 min 90% B, 8-8,4 min 80% B, 8,4-12min 50% B, 13-20min 98% B, gdzie A-woda, B-ACN.

Zbadano także, czy czas parzenia wpływa na zawartość analitów w otrzymywanych naparach. Pomiary zawartości związków polifenolowych prowadzono co 5 min w przedziale czasowym 10-20 min. Nie stwierdzono jednej, uniwersalnej zależności czasu parzenia na stężenie związków polifenolowych w otrzymywanych naparach. Wpływ ten ściśle zależy od

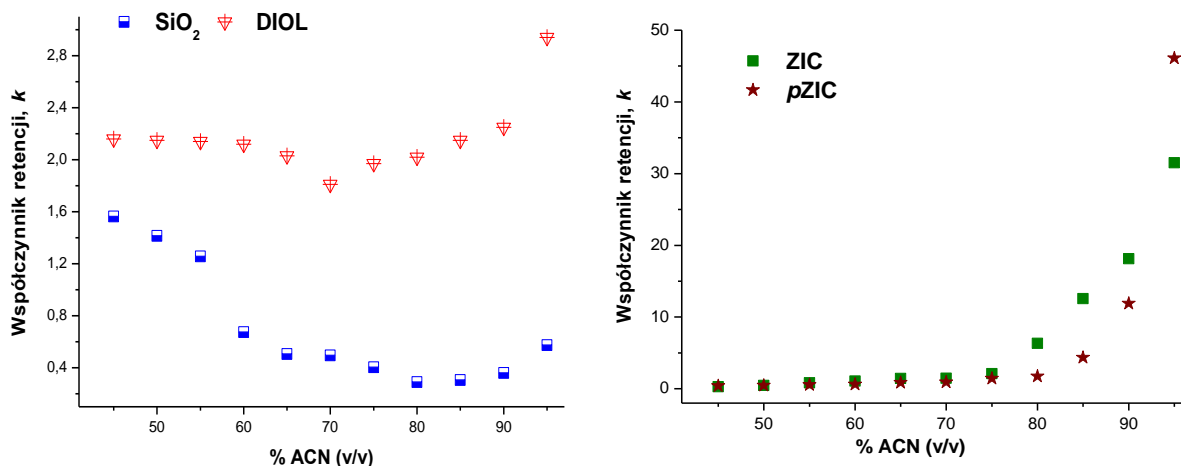
rodzaju związku. Zawartość rutyny w poszczególnych naparach spadała wraz z wydłużaniem czasu ekstrakcji. Odwrotną tendencję zaobserwowano dla kwasów kawowego i *p*HBA (Rys. 65.)



Rys. 65. Wpływ czasu parzenia na zawartość związków polifenolowych w naparze: A-melisy oraz B- rumianku.

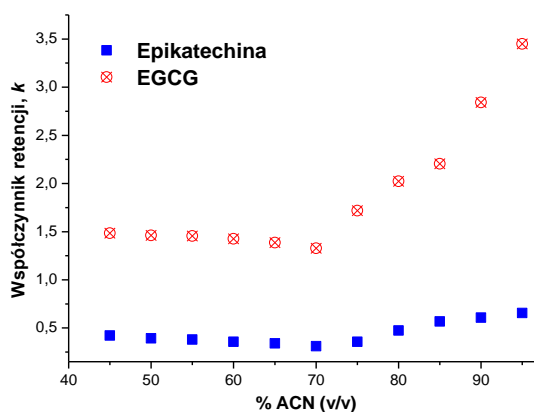
Kolejnym etapem badań było sprawdzenie potencjału chromatografii oddziaływań hydrofilowych w analizie katechin w naparach zielonej herbaty. Zazwyczaj do analizy tych związków stosowana jest chromatografia w odwróconym układzie faz. W początkowych etapach badań sprawdzono wpływ zawartości rozpuszczalnika organicznego w fazie ruchomej na retencję katechiny, epikatechiny oraz galusanu epigallokatechiny (EGCG). Dla

katechiny otrzymano największe wartości współczynników retencji, szczególnie stosując kolumny sulfobetainowe (Rys. 66).



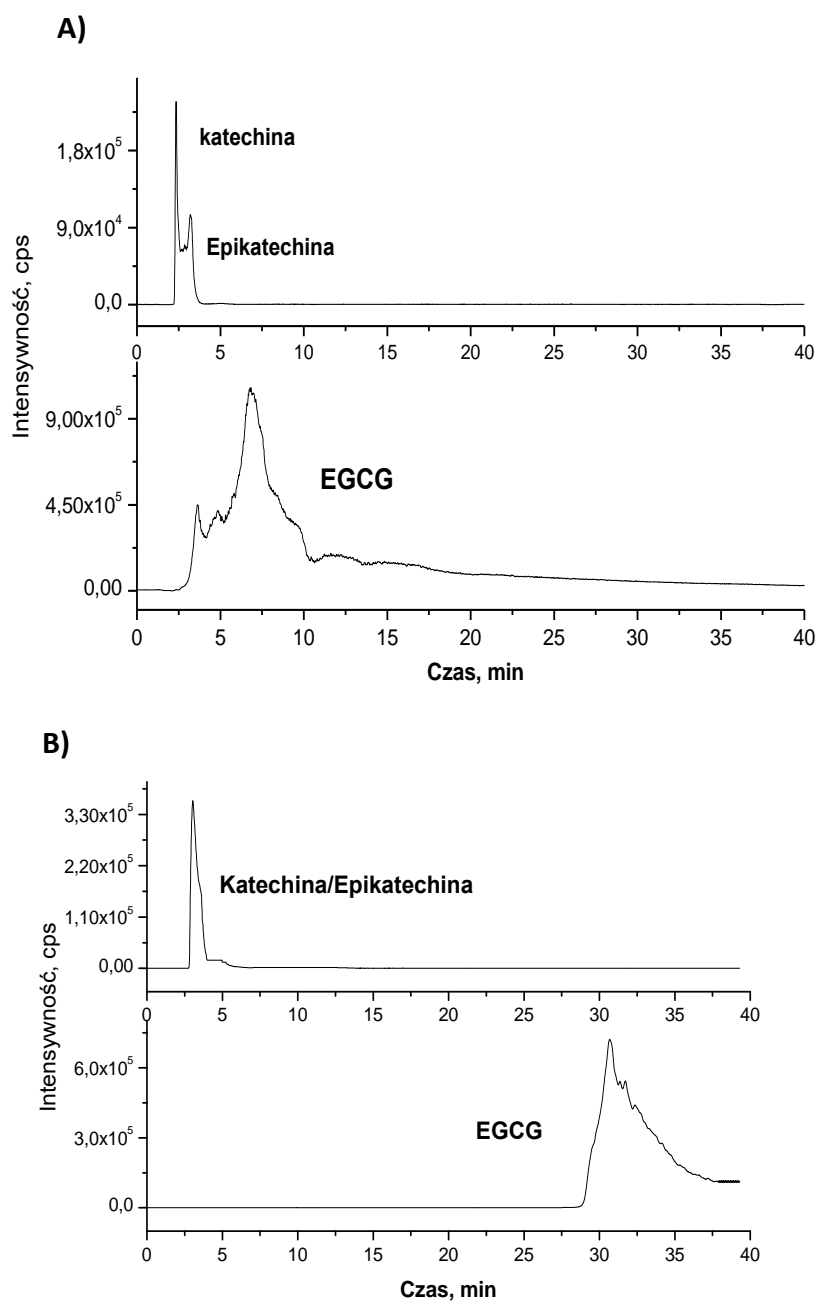
Rys. 66. Zależność wartości współczynników retencji katechiny na czterech stosowanych w trybie HILIC kolumnach.

Ze względu na zbyt wysoką retencję katechiny na złożu sulfobetainowym, do dalszych badań zdecydowano się zastosować kolumnę diolową (Luna HILIC), przy użyciu której dla wszystkich badanych związków obserwowano paraboliczny przebieg krzywej zależności współczynników retencji od zawartości ACN w fazie ruchomej (rys. 67).



Rys. 67. Zależność wartości współczynników retencji epikatechiny i EGCG na kolumnie diolowej.

Kolumnę Luna HILIC wykorzystano w analizie naparów zielonej herbaty. Próbkę przygotowano przez dodanie 50 mL świeżo zagotowanej wody do 1,7 g suchej herbaty, a następnie parzenie przez 10 min. Jako optymalną metodę uznano izokratyczną elucję z wykorzystaniem 95% ACN oraz 15 mM kwasu mrówkowego lub octanu amonu. Zarejestrowane chromatogramy przedstawiono na rysunku 68.



Rys 68. Chromatogramy naparu z zielonej herbaty. Eluent: A) 95% ACN/5% 15 mM HCOOH;
B) 95% ACN/ 15 mM CH₃COOH

Zaobserwowana kolejność elucji (katechina< epikatechina< EGCG) jest analogiczna jak w przypadku chromatografii w układzie faz odwróconych. Zastosowanie kwasu mrówkowego miało kluczowe znaczenie dla rozdzielenia katechiny i epikatechiny. Rozdzielenia tych dwóch związków nie udało się uzyskać stosując octan amonu jako wodny składnik eluentu. Wraz ze wzrostem pH zaobserwowano także znaczne wydłużenie się czasu retencji EGCG.

Chromatografia oddziaływań hydrofilowych może być alternatywną techniką w stosunku do RP-HPLC w analizie flawonoidów w próbkach naturalnych. Niewątpliwą zaletą tej techniki jest znaczny wzrost czułości oznaczeń, gdy jako metodę detekcji zastosuje się spektrometr mas. Fakt ten może być kluczowy, gdy anality występują w próbce w bardzo niskim stężeniu. Opisane w niniejszym rozdziale przykłady pokazują potencjał chromatografii HILIC, która zaczyna konkurować z najczęściej stosowaną do tej pory chromatografią w układzie faz odwróconych.

9. Podsumowanie

Wyniki zebrane w niniejszej rozprawie doktorskiej stanowią kompleksowe badania retencji flawonoidów na wybranych fazach stacjonarnych stosowanych w chromatografii HILIC. Sprawdzone wpływ procentowej zawartości rozpuszczalnika organicznego w eluencie na retencję flawonoidów, jego rodzaj, pH eluentu, stężenie soli w fazie ruchomej oraz temperatury w jakiej prowadzona jest analiza. Kolumny diolowa oraz silikażelowa wykazywały pewne podobieństwa. W obydwu przypadkach retencja flawonoidów na złożu była niewielka, a krzywe zależności współczynnika retencji badanych związków od procentowej zawartości rozpuszczalnika organicznego w eluencie miały kształt paraboli (ACN jako składnik eluentu). Zdecydowanie większą retencję flawonoidy wykazywały na złożu sulfobetainowym. W przypadku tego złoża wspomniane zależności miały prostoliniowy przebieg, a wzrost stężenia rozpuszczalnika organicznego w fazie ruchomej powoduje wzrost czasu retencji dla wszystkich analizowanych związków.

Nie zauważono wyraźnego wpływu pH wodnego składnika eluentu na retencję flawonoidów, natomiast wpływ obecności soli w eluencie oraz jej stężenia ściśle zależy od rodzaju stosowanego złoża. W przypadku kolumny diolowej ze wzrostem stężenia soli obserwowano wydłużenie czasów retencji badanych związków, ale już przy zastosowaniu kolumny sulfobetainowej był odwrotny efekt.

Wzrost temperatury, w której prowadzone jest rozdzielanie nieznacznie obniża czasy retencji, jednak prostoliniowość izotermy van't Hoffa w przypadku kolumny ZIC-HILIC była tylko dla MeOH.

Poczynione obserwacje pokazują jak bardzo złożony i od jak wielu czynników zależny jest mechanizm retencji flawonoidów w chromatografii oddziaływań hydrofilowych. Zbadano więc dopasowanie danych eksperymentalnych do modeli matematycznych opisujących zarówno podział analitu między oraz jego adsorpcję bezpośrednio na złożu dla poszczególnych grup związków z rodziny flawonoidów. W celu dokonania bardziej precyzyjnych obserwacji badane związki podzielono na mniejsze grupy: flawony (chryzyna, apigenina, luetolina, genisteina), flawanony (hesperetyna, hesperydyna, naringenina, naringina), flawonole (ramnetyna, kemferol, kwercetyna, moryna), oraz glikozydy (rutyna, kwercytryna, naringina, hesperydyna). Ze względu na zbliżoną polarność do grupy

glikozydów włączono także katechinę. Współczynniki determinacji badanych zależności otrzymane z zastosowaniem acetonitrylu jako składnika eluentu przedstawiono w tabeli 32.

Tabela 32. Współczynniki determinacji zależności opisujących model podziałowy i adsorpcyjny dla poszczególnych grup flawonoidów. Eluent: ACN lub MeOH/H₂O, 95/5%.

Kolumna	Flawony	Flawanony	Flawonole	Glikozydy
ACN				
Silica	0,7123	0,9834	0,2755	0,8920
Diol	0,7435	0,9622	0,6515	0,6842
ZIC	0,9948	0,6928	0,8782	0,2206
<i>p</i> ZIC	0,9947	0,6931	0,8783	0,5068
MeOH				
Silica	0,1241	0,3805	0,0969	0,2077
Diol	0,9450	0,9369	0,3230	0,7545
ZIC	0,9662	0,8421	0,9199	0,8508
<i>p</i> ZIC	0,8840	0,8212	0,9863	0,6152

W przypadku flawonów bardzo wysoką wartość współczynnika dopasowania do modelu podziałowego otrzymano dla kolumn sulfobetainowych, dla kolumny silikażelowej oraz diolowej wartość ta była nieco niższa. Sugeruje to, że za retencję flawonów w całości (kolumny ZIC-HILIC i *p*ZIC-HILIC) lub w bardzo dużym stopniu (Atlantis HILIC i LUNA HILIC) odpowiedzialny jest hydrofilowy podział analitu. Odwrotne zależności uzyskano dla flawanonów; znacznie większe współczynniki retencji otrzymano dla kolumn silikażelowej i diolowej. Współczynnik determinacji dopasowania do modelu podziałowego dla flawonoli wzrasta w szeregu: kolumna silikażelowa < diolowa < fazy sulfobetainowe, co sugeruje wzrost udziału mechanizmu hydrofilowego podziału dla tej grupy flawonoidów.

Najbardziej zróżnicowanie pod względem wartości współczynników determinacji dopasowania do modelu podziałowego otrzymano dla grupy glikozydów i katechiny. Są to najbardziej polarne związki z całej analizowanej grupy. Najniższy współczynnik determinacji dopasowania otrzymano dla kolumny ZIC-HILIC z użyciem acetonitrylu. Co ciekawe był on

znacząco różny od współczynnika otrzymanego dla kolumny *p*ZIC-HILIC. Wynik taki może sugerować znaczny udział matrycy złoża w procesie rozdzielania. W przypadku polimerycznej matrycy oddziaływania te są ograniczone, co powoduje wzrost udziału modelu podziałowego w mechanizmie rozdzielania. Dla kolumny silikażelowej przy zastosowaniu metanolu jako składnika fazy ruchomej otrzymano najniższe wartości współczynnika determinacji dla obu mechanizmów retencji dla badanych grup związków flawonoidowych. Dla tej fazy stacjonarnej także dla wszystkich badanych związków uzyskano najniższe współczynniki dopasowania dla modelu podziałowego i adsorpcyjnego (rys. 53-54).

Otrzymane wyniki pokazują jak trudnym zadaniem jest jednoznaczne określić jaki jest wiodący mechanizm retencji flawonoidów na każdym badanym złożu. Zbliżone wartości współczynników dopasowania do modelu podziałowego i adsorpcyjnego sugerują na mieszany mechanizm retencji, co potwierdza duży udział wymiany jonowej w mechanizmie rozdzielania. Należy jednak zauważyć, że dopasowanie do mieszanego modelu mechanizmu retencji jest zależne indywidualnie od rozpatrywanego analitu. Mechanizm rozdzielania flawonoidów w trybie HILIC, niezależnie od rodzaju stosowanej fazy stacjonarnej, ma charakter wielowymiarowy, a mała modyfikacja warunków ich analizy chromatograficznej może zmieniać udział poszczególnych składowych do całkowitego mechanizmu retencji. Najrozsądniej jest uznać, że w przypadku flawonoidów mechanizm rozdzielania ma charakter mieszany, w którym zarówno podział jak i adsorpcja są jednakowo ważne. Wpływając na udział każdego z nich w wypadkowym mechanizmie rozdzielania, możemy wpływać na selektywność danego rozdzielania. Właśnie ta wielowymiarowość procesu zachodzącego w kolumnie chromatograficznej czyni HILIC techniką wyjątkową, ale i wymagającą o wiele więcej czasu na optymalizację niż inne. Jednakże zwiększona czułość detekcji z wykorzystaniem spektrometrii mas oraz wiele ułatwień na etapie już samego przygotowania próbek sprawia, że jeszcze długo obserwować będziemy wzrost zainteresowania analityków tą właśnie techniką.

Bibliografia

1. A.J. Alpert, *Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds*, Journal of Chromatography A 499, 1990, 177-196.
2. J.C. Lindan, C.L. Lowhead, *Liquid chromatography of saccharides*, Journal of Chromatography A 105, 1975, 125-133.
3. J.K. Palmer, *A versatile system for sugar analysis via liquid chromatography*, Analytical Letters 8, 1975, 215-224.
4. B. Buszewski, S. Noga, *Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique*, Analytical and Bioanalytical Chemistry 402, 2012, 231-247.
5. A. Heckerdorf, *The CHROMacademy Essential Guide to Understanding Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC) Part 1*, LC-GC Chromacademy.
6. P. Tundro, P. Venturello, E. Angeletti, *Anion-exchange properties of ammonium salts immobilized on silica gel*, Journal of American Chemical Society 104, 1982, 6547-6551.
7. A. Goncalves, C. Airoidi, *Some features of 2 and 4-aminopyridines anchored on silica gel: Properties and chemisorption of metal(II) chlorides in non-aqueous solutions*, Polyhedron 8, 1989, 2901-2906.
8. M.L. Nunes, C. Airoidi, *Lamellar titanium hydrogenphosphate: synthesis, ion-exchange and intercalation*, Quim Nova 24, 2001, 199-807.
9. S. Kowalska, K. Krupczyńska, B. Buszewski, *The influence of the mobile phase pH and the stationary phase type on the selectivity tuning in high performance liquid chromatography nucleosides separation*, Journal of Separation Science 28, 2005, 1502-1511.
10. J.H. Knox, R. Kaliszan, *Theory of solvent disturbance peaks and experimental determination of thermodynamic dead-volume in column liquid chromatography*, Journal of Chromatography 349, 1985, 211-234.
11. A. Carreno, E. Schott, X. Zarate, R. Arratie-Perez, J.C. Vega, Mardones M., J.M. Manriquez, I. Chavez, *Adsorption essays of palladium in modified silica gel with thiouronium groups: experimental and theoretical studies*, Journal of Chilean Chemical Society 56, 2011, 692-696.
12. P. Jandera, M. Holcapek, L. Kolarova, *Retention mechanism, isocratic and gradient-elution separation and characterization of (co)polymers in normal-phase and reversed-phase high-performance liquid chromatography*, Journal of Chromatography A 869 (2000) 65-84.
13. P. Jandera, J. Urbanek, B. Prokes, H. Blazkova-Brunova, *Chromatographic behaviour of oligoethylene glycol nonylphenyl ether anionic surfactants in normal-phase high-performance liquid chromatography*, Journal of Chromatography A 736, 1996, 131-140.

14. T. Yoshida, T. Okada, *Peptide separation in normal-phase liquid chromatography: Study of selectivity and mobile phase effects on various columns*, Journal of Chromatography A 840, 1999, 1-9.
15. F. Marclay, M. Saugy, *Determination of nicotine and nicotine metabolites in urine by hydrophilic interaction chromatography–tandem mass spectrometry: Potential use of smokeless tobacco products by ice hockey players*, Journal of Chromatography A 1217, 2010, 7528-7538.
16. A. Sentkowska, M. Biesaga, K. Pyrzyńska, *Effects of the operation parameters on HILIC separation of flavonoids on zwitterionic column*, Talanta 115, 2013, 284-290.
17. „Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC) and advanced application” Red. P.G. Wang, W. He) CRC Press, 2011.
18. L. Moni, A. Ciogli. I. D'Acquarica, A. Dondoni, F. Gasparrini, A. Marra, *Synthesis of sugar-based silica gels by copper-catalysed azide-alkyne cycloaddition via a single-step azido-activated silica intermediate and the use of the gels in hydrophilic interaction chromatography*, Chemistry 19, 2010, 5712-5722.
19. H. Zhang, Z. Guo, Z. Zhang, Q. Xu, X. Ziang, *HILIC for separation of co-eluted flavonoids under RP-HPLC mode*, Journal of Separation Science 31, 2008, 1623- 1627.
20. C. T. Mant, R. S. Hodges, *Mixed-mode hydrophilic interaction/cation-exchange chromatography (HILIC/CEX) of peptides and proteins*, Journal of Separation Science 31, 2008, 2754-2773.
21. J. Courtois, E. Byström, K. Irgum, *Novel monolithic materials using poly(ethylene glycol) as porogen for protein separation*, Polymer 47, 2006, 2603-2611.
22. M. Liu, J. Ostovic, X.E. Chem, E. Cauchon, *Hydrophilic interaction liquid chromatography with alcohol as a weak eluent*, Journal of Chromatography A 1216, 2009, 2362-2370.
23. R.P. Li, J.X. Huang, *Chromatographic behavior of epirubicin and its analogues on high-purity silica in hydrophilic interaction chromatography*, Journal of Chromatography A 1041, 2004, 163-169.
24. A.E. Karatapanis, Y.C. Fiamegos, C.D. Stalikes, *Study of the behavior of water-soluble vitamins in HILIC on a diol column*, Chromatographia 71, 2010, 751-759.
25. Z. Hao, B. Xiao, N. Weng, *Impact of column temperature and mobile phase components on selectivity of hydrophilic interaction chromatography (HILIC)*, Journal of Separation Science 31, 2008, 1449-1464.
26. K.J. Fountain, J. Xu, D.M. Diehl, D. Morrison, *Influence of stationary phase chemistry and mobile-phase composition on retention, selectivity, and MS response in hydrophilic interaction chromatography*, Journal of Separation Science 33, 2010, 740-751.
27. D.V. McCalley, *Is hydrophilic interaction chromatography with silica column a viable alternative to reserved-phase liquid chromatography for the analysis of ionisable compounds?*, Journal of Chromatography A 1171, 2007, 46-55.

28. X. Subirats, M. Roses, E. Bosch, *On the effect of organic solvent composition on the pH of buffered HPLC mobile phases and the pKa of analytes-A review*, Separation and Purification Reviews 36, 2007, 231-255.
29. A.E. Karatapanis, Y.C. Fiamengos, C.D. Stalikas, *HILIC separation and quantification of water-soluble vitamins using diol column*, Journal of Separation Science 32, 2009, 909-917.
30. H.P. Nguyen, S.H. Yang, J.G. Wigginton, J.W. Simpkins, K.A. Schug, *Retention behavior of estrogen metabolites on hydrophilic interaction chromatography stationary phases*, Journal of Separation Science 33, 2010, 793-802.
31. P. Jandera, *Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review*, Analytica Chimica Acta, 692, 2011, 1-25.
32. E.P. Kadar, Ch.E. Wujcik, *Remediation of undesirable secondary interactions encountered in hydrophilic interaction chromatography during development of a quantitative LC-MS/MS assay for a dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitor in monkey serum*, Journal of Chromatography B 877, 2009, 471-476.
33. H.M. Merken, G.R. Beecher, *Liquid chromatographic method for the separation and quantification of prominent flavonoid aglycones*, Journal of Chromatography A 897, 2000, 177-184.
34. C.W. Huck, M.R. Buchmeiser, G.K. Bonn, *Fast analysis of flavonoids in plant extracts by liquid chromatography-ultraviolet absorbance detection on poly(carboxylic acid)-coated silica and electrospray ionization tandem mass spectrometric detection*, Journal of Chromatography A 943, 2001, 33-38.
35. M. Liu, J. Ostovic, E.X. Hen, N. Cauchon, *Hydrophilic interaction liquid chromatography with alcohol as a weak eluent*, Journal of Chromatography A 1216, 2009, 2362-2370.
36. A. dos Santos-Pereira, A. Giron Jimenez, E. Admasu, P. Sandra, *Green hydrophilic interaction chromatography using ethanol-water-carbon dioxide mixtures*, Journal of Separation Science 33, 2010, 834-837.
37. Y. Guo, S. Gaiki, *Retention and selectivity of stationary phases for hydrophilic interaction chromatography*, Journal of Chromatography A 1218, 2011, 5920-5938.
38. P. Hemström, K. Irgum, *Hydrophilic interaction chromatography*, Journal of Separation Science 29, 2006, 1784-1821.
39. D.V. McCalley, *Study of selectivity, retention mechanism and performance of alternative silica-based stationary phases for separation of ionized solutes in hydrophilic interaction chromatography*, Journal of Chromatography A 1217, 2010, 3408-3417.
40. G. Schuster, W. Lindner, *Comparative characterization of hydrophilic interaction liquid chromatography columns by linear solvation energy relationship*, Journal of Chromatography A 1273, 2013, 73-94.
41. E. Wikberg, T. Sparrman, C. Viklund, T. Jonson, K. Irgum, *A 2H nuclear magnetic resonance study of the state of water in neat silica and zwitterionic stationary phases*

- and its influence on the chromatographic retention characteristic in hydrophilic interaction high-performance liquid chromatography*, Journal of Chromatography A, 1218, 2011, 6630-6638.
42. R.J. Chrita, C. West, A.L. Finaru, C. Elfakir, *Approach to hydrophilic interaction chromatography column selection: Application to neurotransmitters analysis*, Journal of chromatography A 1217, 2010, 3091-3104.
 43. G. Greco, T. Letzel, *Main interactions and influences of the chromatographic parameters in HILIC separations*, Journal of Chromatographic Science 51, 2013, 684-693.
 44. P. Vajda, A. Felinger, G. Guiochon, *Evaluation of surface excess isotherms in liquid chromatography*, Journal of Chromatography A 1291, 2013, 41-47.
 45. M. Jovanovic, T. Rakic, B. Janic-Stojanovic, *Theoretical and empirical models in hydrophilic interaction liquid chromatography*, Instrumentation Science and Technology 42, 2014, 230-266.
 46. F. Gritti, G. Guiochon, *Critical contribution of nonlinear chromatography to the understanding of retention mechanism in reversed-phase liquid chromatography*, Journal of Chromatography A 1099, 2005, 1-42.
 47. Y. Li, Y. Feng, T. Cheng, H. Zhang, *Imidazole type stationary phase for hydrophilic interaction chromatography and reversed-phase liquid chromatography*, Journal of Chromatography A 1218, 2011, 5987-5994.
 48. G.S. Philibert, S.V. Olesik, *Characterization of the separation of nucleosides and nucleotides*, Journal of Chromatography A 1218, 2011, 8222-8230.
 49. H. Gika, G. Theodoridis, F. Mattivi, U. Vrhovsek, A. Pappa-Louisi, *Retention prediction of a set of amino acids under gradient elution conditions in hydrophilic liquid chromatography*, Journal of Separation Sciences 35, 2012, 376-383.
 50. M.G. Kokotou, N.S. Thomaidis, *Behaviour and retention models of melamine and its hydrolysis products*, Chromatographia 75, 2012, 457-467.
 51. X. Dai, X. Qian, B. Gong, Y. Wei, *Tetrazole-functionalized silica for hydrophilic interaction chromatography*, Chromatographia 75, 2012, 457-467.
 52. V. Škeriková, P. Jandera, *Effects of the operation parameters on hydrophilic interaction liquid chromatography separation of phenolic acids on zwitterionic capillary columns*, Journal of Chromatography A 1217, 2010, 7981-7989.
 53. B. Chauve, D. Guilleme, P. Cléon, J.L. Veuthey, *Evaluation of various HILIC materials for the fast separation of polar compounds*, Journal of Separation Sciences 33, 2010, 752-764.
 54. S. Noga, P. Jandera, B. Buszewski, *Retention mechanism studies of selected amino acid and vitamin B6 on HILIC columns with evaporative light scattering detection*, Chromatographia 76, 2013, 929-937.

55. G. Greco, S. Grosse, T. Letzel, *Study of the retention behavior in zwitterionic hydrophilic interaction chromatography of isomeric hydroxy- and aminobenzoic acids*, Journal of Chromatography A 1235, 2012, 60-67.
56. G. Jin, Z. Guo, F. Zhang, X. Xue, Y. Jin, X. Liang, *Study on the retention equation in hydrophobic interaction liquid chromatography*, Talanta 76, 2008, 522-527.
57. P. Jandera, T. Hajek, *Utilization of dual retention mechanism on columns with bonded PEG and diol stationary phases for adjusting the separation selectivity of phenolic and flavones natural antioxidants*, Journal of Separation Sciences 32, 2009, 3603-3619.
58. J. Urban, V. Škeriková, P. Jandera, R. Kubičková, M. Pospišilová, *Preparation and characterization of polymethacrylate monolithic capillary columns with dual hydrophilic interaction reversed-phase retention mechanism for polar compounds*, Journal of Separation Sciences 32, 2009, 2530-2543.
59. A.E. Karatapanis, Y.C. Flamegod, C. Stalkis, *A revisit to the retention mechanism of hydrophilic interaction liquid chromatography using model organic compounds*, Journal of Chromatography A 1218, 2011, 2871-2879.
60. J. Soukup, P. Jandera, *Hydrosilated silica-based columns: The effect of mobile phase and temperature on dual hydrophilic-reversed phase separation mechanism of phenolic acids*, Journal of Chromatography A 1228, 2012, 125-134.
61. Y. Guo, S. Gaiki, *Retention behavior of small polar compounds on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography*, Journal of Chromatography A 1074, 2005, 71-80.
62. R.J. Chritia, C. West, S. Zubrzycki, A.L. Finaru, C. Elfakir, *Investigations on the chromatographic behavior of zwitterionic stationary phases used in hydrophilic interaction chromatography*, Journal of Chromatography A 1218, 2011, 5939-5963.
63. A. Wijekoon, M.E. Gangode, R.B. Gregory, *Characterization and multi-mode liquid chromatographic application of 4-propylaminomethyl benzoic acid bonded silica- A zwitterionic stationary phases*, Journal of Chromatography A 1270, 2012, 212-218.
64. A.J. Alpert, *Electrostatic repulsion hydrophilic interaction chromatography for isocratic separation of charged solutes and selective isolation of phosphopeptides*, Analytical Chemistry 80, 2008, 62-76.
65. G.B. Cox, R.W. Stout, *Study of the retention mechanism for basic compounds on silica under „pseudo-reversed-phase condition”* Journal of Chromatography A 384, 1987, 315-336.
66. M. Jovanovic, B.J. Stojanovic, *Through investigation of the retention mechanisms and retention behavior of amides and sulfonamides on amino column in hydrophilic interaction chromatography*. Journal of Chromatography A 1301, 2013, 27-37.
67. P. Kozlik, V. Simova, K. Kalikova, Z. Bosakova, D.W. Armstrong, E. Tesarova, *Effect of silica gel modification with cyclofructans on properties of hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases*, Journal of Chromatography A 1257, 2012, 58-65.

68. Y. Guo, S. Gaiki, *Retention behavior of small polar compounds on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography*, Journal of Chromatography A 1074, 2005, 71- 80.
69. M. Liu, E.X. Chen, R. Ji, D. Semin, *Stability-indicating hydrophilic interaction liquid chromatography method for highly polar and basic compounds*, Journal of Chromatography A 1188, 2008, 255-263.
70. Z Hao, C.Y. Lu, B. Xiao, N. Weng, B. Parker, M. Knapp, C.T. Ho, *Separation of amino acids, peptides and corresponding Amadori compounds on a silica column at elevated temperature*, Journal of Chromatography A 1147, 2007, 165-171.
71. Y. Guo, S. Srinivasen, S. Gaiki, *Investigating the effect of chromatographic conditions on retention of organic acids in hydrophilic interaction chromatography using a design of experiment*, Chromatographia 66, 2007, 223-229.
72. J. Zhang, X. Dai, F. Xu, F. Wang, B. Gong, Y. Wei, *Preparation of imidazole-functionalized silica by surface-initiated atom transfer radical polymerization and its application for hydrophilic interaction chromatography*, Analytical and Bioanalytical Chemistry 404, 2012, 1477-1484.
73. A. Shen, Z. Guo, X. Cai, X. Xue, X. Liang, *Preparation and chromatographic evaluation of cysteine-bonded zwitterionic hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phase*, Journal of Chromatography A 1228, 2012, 175-182.
74. R.I. Chirita, C. West, S. Zubrzycki, A.L. Finaru, C. Elfakir, *Investigations on the chromatographic behavior of zwitterionic stationary phases used in hydrophilic interaction chromatography*, Journal of Chromatography A 1218, 2012, 5939-5963.
75. N.S. Quiming, N.L. Denola, Y. Saito, A.P. Catabay, K. Jinno, *Chromatographic behavior of uric acid and methyl uric acids on a diol column in HILIC*, Chromatographia 67, 2008, 507-515.
76. J. Heaton, N. Gray, D.A. Cowan, R.S. Plumb, C. Legido-Quigley, N.W. Smith, *Comparison of reversed-phase and hydrophilic interaction liquid chromatography for the separation of ephedrine*, Journal of Chromatography A 1228, 2012, 329-337.
77. M.R. Gama, R.G. da Costa Silva, G.H. Collins, C.B.G. Bottoli, *Hydrophilic interaction chromatography*, Trends in Analytical Chemistry 37, 2012, 48-60.
78. P.H. Nguyen, K.A. Schug, *The advantages of ESI-MS detection in conjunction with HILIC mode separations: Fundamentals and applications*, Journal of Separation Science 31, 2008, 1465-1480.
79. M. Malavolta, F. Bocci, E. Boselli, N.G. Frega, *Normal phase liquid chromatography- electrospray ionization tandem mass spectrometry analysis of phospholipid molecular species in blood molecular cells: application to cystic fibrosis*, Journal of Chromatography B 810, 2004, 173-186.
80. D.Y. Shang, M.G. Ikononou, R.W. Macdonald, *Quantitative determination of nonylphenol polyethoxylate surfactants in marine sediment using normal-phase liquid chromatography-electrospray mass spectrometry*, Journal of Chromatography A 849, 1999, 467-482.
81. M. Girod, C. Delavent, L. Charles, *Analysis of amitrole by normal-phase liquid chromatography and tandem mass spectrometry using a sheath liquid electrospray interface*, Rapid Communications in Mass Spectrometry 20, 2006, 892-896.

82. L. Mora, M-C. Aristoy, F. Toldra, *Retention Characteristics of Four Different HILIC Stationary Phases in the Analysis of Meat Polar Compounds*, Food Analytical Methods 5, 2012, 604-6012.
83. L. Novakova, D. Solichowa, S. Pavlovicova, P. Solich, *Hydrophilic interaction liquid chromatography method for the determination of ascorbic acid*, Journal of Separation Science 31, 2008, 1634-1644.
84. X. Yao, G. Zhou, Y. Tang, H. Pang, Y. Qian, S. Guo, X. Mo, S. Zhu, S. Su, D. Qian, *Direct determination of underivatized amino acids from Ginkgo biloba leaves by using hydrophilic interaction ultra high performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry*, Journal of Separation Science 36, 2013, 2878-2887.
85. W. Naidong, W. Zhou, Q. Song, S. Zhou, *Direct injection of 96-well organic extracts onto a hydrophilic interaction chromatography/tandem mass spectrometry system using a silica stationary phase and an aqueous/organic mobile phase*, Rapid Communications in Mass Spectrometry 18, 2004, 2963-2968.
86. M.G.M. Kok, J.R. Swam, D.I. Wilson, G.W. Somsen, G.J. de Jong, *Hydrophilic interaction chromatography–mass spectrometry for anionic metabolic profiling of urine from antibiotic-treated rats*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 92, 2014, 98-104.
87. T. Ikegami, H. Fujita, K. Horia, K. Hosoya, N. Tanaka, *HILIC mode separation of polar compounds by monolithic silica capillary columns coated with polyacrylamide*, Analytical and Bioanalytical Chemistry 386, 2006, 578-585.
88. A. Berthold, S.S.C. Chang, J.P.S. Kullman, D.W. Armstrong, *Practice and mechanism of HPLC oligosaccharide separation with a cyclodextrin bonded phase*, Talanta 47, 1998, 1001-1002.
89. J. Far, H. Preud'Homme, R. Łobiński, *Detection and identification of hydrophilic selenium compounds in selenium-rich yeast by size exclusion–microbore normal-phase HPLC with the on-line ICP–MS and electrospray Q-TOF-MS detection*, Analytica Chimica Acta 657, 2010, 175-190.
90. L. Lojkova, B. Klejdus, J. Morovacova, V. Kuban, *Supercritical fluid extraction (SFE) of 4(5)-methylimidazole (4-Mel) and 2-acetyl-4(5)-(1,2,3,4)-tetrahydroxybutyl-imidazole (THI) from ground-coffee with high-performance liquid chromatographic electrospray mass spectrometric quantification (HPLC/ESI-MS)*, Food Additives and Contaminants, 23, 2006, 963-973.
91. Tai, E. Gohola, *Determination of ascorbic acid and its related compounds in foods and beverages by hydrophilic interaction liquid chromatography*, Journal of Chromatography B 853, 2007, 214-220.
92. A. Sentkowska, M. Biesaga, K. Pyrżyńska, *Polyphenolic composition and antioxidative properties of lemon balm (Melissa officinalis L.) extract affected by different brewing*

- processes, International Journal of Food Properties DOI: 10.1080/10942912.2014.960932.
93. S.D. Garbis, A. Melse-Boonstra, C.E. West, R.B. van Breemen, *Determination of folates in human plasma using hydrophilic interaction chromatography–tandem mass spectrometry*, Analytical Chemistry 73, 2001, 5358-5364.
 94. W. Zou, J. She, V.V. Tolstikov, *A Comprehensive Workflow of Mass Spectrometry-Based Untargeted Metabolomics in Cancer Metabolic Biomarker Discovery Using Human Plasma and Urine*, Metabolites 3, 2013, 787-819.
 95. D. Takahiro, A. Takeola, K. Keimura, A. Asada, *Characterization of the decompositions of compounds derived from imidazolidinyl urea in cosmetics and patch materials*, Contact Dermatitis 67, 2012, 284-293.
 96. W.Z. Shou, L-Y. Chen, A. Eerkes, Y.Q. Tang, L. Magis, X. Jiang, W. Naidong, *Ultrafast liquid chromatography/tandem mass spectrometry bioanalysis of polar analytes using packed silica columns*, Rapid Communications in Mass Spectrometry 16, 2002, 1613-1621.
 97. J. Xia, N. Zhou, C. Zhou, B. Chen, Y. Wu, S. Yao, *Simultaneous determination of melamine and related compounds by hydrophilic interaction liquid chromatography–electrospray mass spectrometry*, Journal of Separation Science 33, 2010, 2688- 2697.
 98. F. Pelatti, S. Benvenuti, *Fast high-performance liquid chromatography analysis of phenethylamine alkaloids in Citrus natural products on a pentafluorophenylpropyl stationary phase*, Journal of Chromatography A 1165, 2007, 58-66.
 99. T. Hayama, H. Yoshida, K. Todoki, H. Nohta, M. Yamaguchi, *Determination of polar organophosphorus pesticides in water samples by hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry*, Rapid Communications in Mass Spectrometry 22, 2008, 2203-2210.
 100. J.C. Giddings, *Sample dimensionality: a predictor of order-disorder in component peak distribution in multidimensional separation*, Journal of Chromatography A 703, 1995, 3-15.
 101. P.J. Slonecker, X. Li, T.H. Ridgway, J.G. Dorsey, *Informational orthogonality of two-dimensional separations*, Analytical Chemistry 68, 1996, 682-689.
 102. P. Jandera, *Column selection for two-dimensional LC x LC*, LC-GC Europe 20, 2007, 510-525.
 103. P. Jandera, T. Hajek, V. Skerikova, J. Soukop, *Dual hydrophilic interaction-RP retention mechanism on polar columns: Structural correlations and implementation for 2-D separations on a single Column*, Journal of Separation Science 33, 2010, 841-852.
 104. K.M. Kalili, A. de Villiers, *Off-line comprehensive two-dimensional hydrophilic interaction×reversed phase liquid chromatographic analysis of green tea phenolics*, Journal of Separation Science 33, 2010, 853-863.
 105. J. Zeng, X. Zhang, Z. Guo, J. Feng, J. Zeng, X. Xue, X. Liang, *Separation and identification of flavonoids from complex samples using off-line two-dimensional liquid*

- chromatography tandem mass spectrometry*, Journal of Chromatography A 1220, 2012, 50-56.
106. Boersema PJ, Divecha N, Heck AJR, Mohammed S. "Evaluation and optimization of ZIC-HILIC-RP as an alternative MudPIT strategy", Journal of Proteome Research 6, 2007, 937-946.
 107. Y. Jin, T. Liang, Q. Fu, Y.S. Xiao, J.S. Feng, Y.X. Ke, X.M. Liang, *Fingerprint analysis of Ligusticum chuanxiong using hydrophilic interaction chromatography and reversed-phase liquid chromatography*, Journal of Chromatography A 1216, 2009, 2136-2141.
 108. Q. Ren, C. Wu, J. Zhang, *Use of on-line stop-flow heart-cutting two-dimensional high performance liquid chromatography for simultaneous determination of 12 major constituents in tartary buckwheat (Fagopyrum tataricum Gaertn)*, Journal of Chromatography A 1304, 2013, 257-262.
 109. T. Beelders, K.M. Kalili, E. Joubert, D de Beer, A. de Villiers, *Comprehensive two-dimensional liquid chromatographic analysis of rooibos (Aspalathus linearis) phenolics*, Journal of Separation Science 35, 2012, 1808-1820.
 110. Y. Wang, X. Lu, G. Xu, *Simultaneous separation of hydrophilic and hydrophobic compounds by using an online HILIC-RPLC system with two detectors*, Journal of Separation Science 31, 2008, 1564-1572.
 111. L. Montero, M. Herreo, E. Ibanez, A. Civeres, *Separation and characterization of phlorotannins from brown algae Cystoseira abies-marina by comprehensive two-dimensional liquid chromatography*, Electrophoresis 35, 2014, 1644-1651.
 112. S. Louw, S.A. Pereira, F. Lynen, M. Hanna-Brown, P. Sandra, *Serial coupling of reversed-phase and hydrophilic interaction liquid chromatography to broaden the elution window for the analysis of pharmaceutical compounds*, Journal of Chromatography A 1208, 2008, 90-94.
 113. A. D'Attoma, C. Grivel, S. Heinisch, *On-line comprehensive two-dimensional separations of charged compounds using reversed-phase high performance liquid chromatography and hydrophilic interaction chromatography. Part I: Orthogonality and practical peak capacity considerations*, Journal of Chromatography A 1262, 2012, 148-159.
 114. H. Loftheim, T.D. Nguyen, H. Malerod, E. Lundanes, A. Asberg, L. Reubsest, *2-D hydrophilic interaction liquid chromatography-RP separation in urinary proteomics – Minimizing variability through improved downstream workflow compatibility*, Journal of Separation Science 33, 2010, 864-872.
 115. Y. Liu, Z. Guo, J. Feng, X. Xue, Z.F. Xu, X. Liang, *Development of orthogonal two-dimensional hydrophilic interaction chromatography systems with the introduction of novel stationary phases*, Journal of Separation Science 32, 2009, 2871-2876.
 116. Y. Liu, X. Xue, Z. Guo, Q. Xu, F. Zhang, X. Liang, *Novel two-dimensional reversed-phase liquid chromatography/hydrophilic interaction chromatography, an excellent orthogonal system for practical analysis*, Journal of Chromatography A 1208, 2008, 133-140.

117. C. van Platernik, J. Jansen, M. Hans-Gerd, J. Haver-Kampf, *Application of at-line two-dimensional liquid chromatography–mass spectrometry for identification of small hydrophilic angiotensin I-inhibiting peptides in milk hydrolysates*, Analytical and Bioanalytical Chemistry 391, 2008, 299-307.
118. S.R. Wilson, M. Jankowski, M. Papej, A. Minsilova, F. Boix, G. Vivo Truyols, E. Lundanes, T. Greibrokk, *2D LC separation and determination of bradykinin in rat muscle tissue dialysate with on-line SPE-HILIC-SPE-RP-MS*, Chromatographia 66, 2007, 469-474.
119. A. Mihailova, H. Malerod , S.R. Wilson, B. Karaszewski, R. Hauser, E. Lundanes, P.Greibrokk, *Improving the resolution of neuropeptides in rat brain with on-line HILIC-RP compared to on-line SRX-RP*, Journal of Separation Science 31, 2008, 459-467.
120. Q. Li, F. Lynen, J. Wang, H. Li, G. Xu, P. Sandra, *Comprehensive hydrophilic interaction and ion-pair reversed-phase liquid chromatography for analysis of di- to deca oligonucleotides*, Journal of Chromatography A 1255, 2012, 237-243.
121. S. Abrar, B. Trathnigg, *Separation of nonionic surfactants according to functionality by hydrophilic interaction chromatography and comprehensive two-dimensional liquid chromatography*, Journal of Chromatography A 1217, 2010, 8222-8229.
122. J. Harbone, *The Flavonoids: Advances in Research since 1986*, 1st ed.; Chapman and Hall: London, U.K. 1994.
123. C.A. Rice-Evans, M. Miller, G. Paganga, *Antioxidant properties of phenolic compounds*, Trends in Plant Science 1997, 2, 152-159.
124. P. Hodek , P. Trefil, M. Stiborova, *Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P 450*, Chemico- Biological Interaction 139, 2002, 1-21.
125. M. K'Chahar, N. Sharma, M.P. Dobhal, Y.C. Joshi, *Flavonoids: A verastile source of anticancer drugs*, Pharmacognosy Review 5, 2011, 1-12.
126. M.G.L.Hertog, E.J.M. Feskings, D. Kromhout, P.C.H. Hollman, M.B.Katan, *Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study*. The Lancet 342, 1993, 1007-1011.
127. R.R. Huxley, H.A.A. Neil, *The relation between dietary intake and coronary heart disease mortality: a meta-analysis of prospective cohort studies*. European Journal of Clinical Nutrition 57, 2003, 904-908.
128. A. Soto-Vaca, A. Gutierrez, J.N. Losso, Z. Xu, J.W. Finley, *Evolution of phenolic compounds from color and flavour problems to health benefits*, Journal of Agricultural and Food Chemistry 60, 2012, 6658-6677.
129. D. del Rio, G. Borges, A. Crozier, *Berry flavonoids and polyphenols: bioavailability and evidence of protective effect*, British Journal of Nutrition 104, 2010 (Supl 3), S67-S90.
130. D. Stevenson, R. Hurst, *Polyphenolic phytochemicals- just antioxidants or much more?*, Cellular and Molecular Life Science 64, 2007, 2900-2916.

131. M. Naczek, F. Shahidi, *Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 41, 2006, 1523-1542.
132. A. Podsiadek, D. Sosnowska, J. Łoś, *Ocena efektywności przeciwrodnikowej polifenoli wybranych warzyw*, „Flawonoidy i ich zastosowanie”, red. S. Kopacz Oficyna Wydawnicza Politechniki Rzeszowskiej, 2004; 266-276.
133. I. Wawer, *Aronia polski paradoks*, Wydawnictwo Agropharm 2006.
134. I. Ignat, I. Volf, I. Popa, *A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables*, Food Chemistry 126, 2011, 1821-1835.
135. K. Pyrżyńska, M. Biesaga, *Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey*, Trends Analytical Chemistry 28, 2009, 893-902.
136. J. Dai, R.J. Mumper, *Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties*, Molecules 15, 2010, 7313-7352.
137. K.M. Kalili, A. de Villiers, *Recent developments in the HPLC separation of phenolic compounds*, Journal of Separation Science 34, 2011, 854-876.
138. J.M. Harnly, R.F. Doherty, G.R. Beecher, J.M. Holden, D.B. Haytowitz, S. Bhagwat, S. Gerhard, S., *Flavonoid content of U.S. fruits, vegetables, and nuts*, Journal of Agricultural Food Chemistry 54, 2006, 9966-9977.
139. H. Sakakibara, Y. Honda, S. Nakagawa, H. Ashida, K. Kanazawa, K., *Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas*, Journal of Agricultural and Food Chemistry 51, 2003, 571- 581.
140. J. Jiao, Q-Y. Gai, M. Luo, W. Wang, C-B. Gu, C-J. Zhao, Y.-G. Zu, F-Y. Wei, Y-J. Fu, *Comparison of main bioactive compounds in tea infusions with different seasonal Forsythia suspensa leaves by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and evaluation of antioxidant activity*, Food Research International 53, 2013, 857–863.
141. J. E. Lee, G-S. Kim, S. Park, Y-H Kim, M-B Kim, W. S. Lee, S. W. Jeong, S. J. Lee, J. S. Jin, S. Ch. Shin, *Determination of chokeberry (Aronia melanocarpa) polyphenol components using liquid chromatography–tandem mass spectrometry: Overall contribution to antioxidant activity*, Food Chemistry 146, 2014, 1–5.
142. D. T.-T. Nguyen, D. Guillard S. Rudaz J-L. Veuthey, *Chromatographic behaviour and comparison of column packed with sub-2 μ m stationary phases in liquid chromatography*, Journal of Separation Science 29, 2006, 1836 – 1848.
143. J.E. MacNair, K.C. Lewis, J.W. Jorgenson, *Ultrahigh-pressure reversed-phase liquid chromatography in packed capillary columns*, Analytical Chemistry 69, 1997, 983–989.
144. M. Schwarz, D.A. Rodriguez, D.A. Guillen, C.G. Barroso, *Development and validation of UPLC for the determination of phenolic compounds and furanic derivatives in Brandy de Jerez*, Journal of Separation Science 32 2009 1782-1790.
145. N. Ortega, M-P. Romero, A. Macià, J.i Reguant, N. Anglès, J-R. Morelló, M-J. Motilva, *Comparative study of UPLC–MS/MS and HPLC–MS/MS to determine procyanidins and alkaloids in cocoa samples*, Journal of Food Composition and Analysis 23, 2010, 298–305.

146. A. de Villiers, K.M. Kalili, M. Malan, J. Roodman, *Improving HPLC separation of polyphenols*, LCGC Europe 23, 2010, 466–478.
147. D. Guilleme, C. Casetta, C. Bicchi, J-L. Veuthey, *High throughput qualitative analysis of polyphenols in tea samples by ultra-high pressure liquid chromatography coupled to UV and mass spectrometry detectors*, Journal of Chromatography A 1217, 2010, 6882–6890.
148. A. de Villiers, D. Cabooter, F. Lynen, G. Desmet, P. Sandra, *High-efficiency high performance liquid chromatographic analysis of red wine anthocyanins*, Journal of Chromatography A 1218, 2011, 4660–4670.
149. C. Silva, J. Pereira, V.G. Wouter, C. Giro, J.S. Camara, *A fast method using a new hydrophilic-lipophilic balanced sorbent in combination with ultra-high performance liquid chromatography for quantification of significant bioactive metabolites in wines*, Talanta 86, 2012, 82–90.
150. J. Gonçalves, C.L. Silva, P.C. Castilho, J.S. Cãmara, *An attractive, sensitive and high-throughput strategy based on microextraction by packed sorbent followed by UHPLC-PDA analysis for quantification of hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids in wines*, Microchemical Journal 106, 2013, 129-138.
151. L. Di Donna, D. Taverna, F. Mazzotti, H. Benabdelkamel, M. Attaya, M., A. Napoli, G. Sindona, *Comprehensive assay of flavanones in citrus juices and beverages by UHPLC-ESI-MS/MS and derivatization chemistry*, Food Chemistry 141, 2013, 2338-2333.
152. I. Epriliati, G. Kerven, B. D'Arcyb, M.J. Gidley, *Chromatographic analysis of diverse fruit components using HPLC and UPLC*, Analytical Methods, 2, 2010, 1606-1610.
153. U. Vrhovsek, D. Masuero, M. Gasssperotti, P. Franceschi, L. Caputi, R. Viola, F. Mattivi, *A versatile targeted metabolomics method for the rapid quantification of multiple classes of phenolics in fruits and beverages*, Journal of Agricultural and Food Chemistry 60, 2012, 8831-8840.
154. B. Klejdus, J. Vacek, L. Lojkova, L. Beneskova, V. Kubän, *Ultra-high pressure chromatography of isoflavones and phenolic acids on different stationary phases*, Journal of Chromatography A 1195, 2008, 52-59.
155. J. Oszmiański, J. Kolniak-Ostek, A. Wojdyło, *Application of ultra performance liquid chromatography-photodiode detector-quadrupole/time of flight-mass spectrometry (UPLC-PDA-Q/TOF-MS) method for the characterization of phenolic compounds of Lepidium sativum L. sprouts*, European Food Research and Technology 236, 2013, 699-706.
156. Trautvetter S., Koelling-Speerl., Speer K., *Confirmation of phenolic acids and flavonoids in honeys by UPLC-MS*, Apidologie 40, 2009, 140–150.
157. Nagy K., Redeuil K., Bertholet R., Steiling H., Kussmann M., *Quantification of anthocyanins in milk-based food products by Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*, Analytical Chemistry 81, 2009, 6347-6356.

158. Klejdus B., Vacek J., Benesova L., Kopecky J., Lapcik O., Kuban V., *Rapid resolution HPLC with spectrometric detection for the determination and identification of isoflavones in soy preparations and plant extracts*, Analytical and Bioanalytical Chemistry 389, 2007, 2277–2285.
159. Mayer R., Stecher G., Wuerzner R., Silva R.C., Sultana T., Trojer L., Feuerstein I., Krieg C., Abel G., Popp M., Bobleter O., Bonn G.K., *Proanthocyanidins: target compounds as antibacterial agents*, Journal of Agricultural and Food Chemistry 2008, 56, 6959–6966.
160. Cesla P., Hajek T., Jandera P., *Optimization of two-dimensional gradient liquid chromatography separations*, Journal of Chromatography A 1216, 2009, 3443–3457.
161. Dugo P., Cacciola F., Herrero M., Donato P., Mondello L., *Use of partially porous column as second dimension in comprehensive two-dimensional system for analysis of polyphenolic antioxidants*, Journal of Separation Science 2008, 31, 3297 – 3308.
162. Hajek T., Skerikova V., Cesla P., Vynuchalova K., Jandera P., *Multidimensional LC×LC analysis of phenolic and flavone natural antioxidants with UV-electrochemical coulometric and MS detection*, Journal of Separation Science 31, 2008, 3309–3328.
163. Kalili K.M. de Villers A., *Off-line comprehensive 2-dimensional hydrophilic interaction×reversed phase liquid chromatography analysis of procyanidins*, Journal of Chromatography A 1216, 2009, 6274–6284.
164. Michalkiewicz A., Biesaga M., Pyrzyńska K., *Solid-phase extraction procedure for determination of phenolic acids and some flavonols in honey*, Journal of Chromatography A 1187, 2008, 18–24.
165. de Rijke E., Out P., Niessen W.M.A., Ariese F., Gooijer C., Brinkman U.A., *Analytical separation and detection methods for flavonoids*, Journal of Chromatography A 1112, 2006, 31–63.
166. Wach A., Pyrzyńska K., Biesaga M., *Quercetin content in some food and herbal samples*, Food Chemistry 100, 2007, 699–704.
167. Biesaga M., Wach A., Donten M., Maik J., Pyrzyńska K., *Acidic hydrolysis and extraction of dyes present in plant and ancient textiles*, Chemia Analityczna 51, 2006, 251–265.
168. Surowiec I., Orska-Gawryś J., Biesaga M., Trojanowicz M., Hutta M., Halko R., Urbaniak-Walczak K., *Identification of natural dyestuff in archeological coptic textiles by HPLC with fluorescence detection*, Analytical Letters 36, 2003, 1211–1229.
169. Bolarinwa A., Linseisen J., *Validated application of a new high-performance liquid chromatographic method for the determination of selected flavonoids and phenolic acids in human plasma using electrochemical detection*, Journal of Chromatography B 823, 2005, 143–151.
170. de Rijke E., Zappey H., Ariese F., Gooijer C., Brinkman U.A.Th., *Liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization and electrospray ionization mass spectrometry of flavonoids with triple-quadrupole and ion-trap instruments*, Journal of Chromatography A 984, 2003, 45–58.

171. Biesaga M., Pyrżyńska K., *Liquid chromatography/tandem mass spectrometry studies of the phenolic compounds in honey*, Journal of Chromatography A 1216, 2009, 6620–6626.
172. Stobiecki M., *Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides*, Phytochemistry 54, 2000, 237-256.
173. Troalen L.G., Phillips A.S., Peggie D.A., Barran P.E., Hulme A.N., *Hystorical textile dyeing with Genista tinctoria L.: a comprehensive study by UPLC-MS/MS analysis*, Analytical Methods 6, 2014, 8915-8923.
174. Marozienne A., Nemeikaite-Ceniene A., Vidziunaite R., Cenas N., *Correlation between mammalian cell cytotoxicity of flavonoids and the redox potential of phenoxyl radical/phenol couple*, Acta Biochimica Polonica, Vol 59, 2/2012, 299-305.
175. Rothwell J.A. , Day A.J. , Morgan M.R.A. , *Experimental determination of octanol–water partition coefficients of quercetin and related flavonoids*, Journal of Agricultural and Food Chemistry 53, 2005, 4355-4360.
176. Burda S. Oleszek W., *Antioxidant and antiradical activities of flavonoids*, Journal of Agricultural and Food Chemistry 49, 2001, 2774-2779.
177. Han R-M., Tian Y-X., Liu Y., Chen Ch-H, Ai X-Ch, Zhang J-P., Skibsted L.H., *Comparison of Flavonoids and Isoflavonoids as Antioxidants*, Journal of Agricultural and Food Chemistry 57, 2009, 3780-3785.
178. Itagawa S.K., Nabekura T., Takahashi T., Nakamura N., Sakamoto H.S., Tano H., Hirai M., Tsukahara G., *Structure–activity relationships of the inhibitory effects of flavonoids on P-glycoprotein-mediated transport in KB-C2 cells*, Biological and Pharmaceutical Bulletin 28 (12), 2005, 2274-2278.
179. Srirangam R., Majumdar S., *Passive asymmetric transport of hesperetin across isolated rabbit cornea*, International Journal of Pharmaceutics 394, 2010, 60-67.
180. Musialik M., Kuzmicz R., Pawłowski T., Litwinienko G., *Acidity of hydroxyl groups: an overlooked influence on antiradical properties of flavonoids*, Journal of Organic Chemistry 74, 2009, 2699-2709.
181. Rui-Min H., Yu-Xi T., Yin L., Chang-Hui C., Xi-Cheng Ai., Jian-Ping Z., Skibsted L.H., *Comparison of flavonoids and isoflavonoids as antioxidants*, Journal of Agricultural and Food Chemistry 57, 2009, 3780-3785.
182. Jovanovic S.V., Steenken S., Tosic M., Marjanovic B., Simic M.G., *Flavonoids as Antioxidants*, Journal of the American Chemical Society 116, 1994, 4846-4851.
183. Herrero-Martinez J.M., Sanmartin M., Rosés M., Bosch E., Ràfols C., *Determination of dissociation constants of flavonoids by capillary electrophoresis*, Electrophoresis 26, 2005, 1886-1896.
184. Teixeira S., Siquet C., Alves C., Boal I., Marquez M.P., Borges F., Lima J.F.J.C., Reiss S., *Structure–property studies on the antioxidant activity of flavonoids present in diet*, Free Radical Biology and Medicine 39, 2005, 1099-1108.

185. Remesova S., Sokolova R., Degano I., Bulickova J., Zabka J., Gal M., *On the stability of the bioactive flavonoids quercetin and luteolin under oxygen-free conditions*, Analytical and Bioanalytical Chemistry 402, 2012, 975-982.
186. Rosenholm J.M., Czuryzkiewicz T., Kleitz F., Rosenholm J.B., Linden M., *On the nature of the Bronsted acidic groups on native and functionalized mesoporous siliceous SBA-15 as studied by benzylamine adsorption from solution*, Langmuir 23, 2007, 4315-4323.
187. Bocian S., Felinger A., Buszewski B., *Comparison of solvent adsorption on chemically bonded stationary phases in reversed phase liquid chromatography*, Chromatographia 68, 2008, S19-S26.

Załącznik 1

Spis publikacji

1. Sentkowska A., Biesaga M., Pyrżyńska K., "Evaluation of ZIC-HILIC columns for the analysis of flavonols " , Current Topics in Analytical Chemistry 9, 2012, 49-55.
2. Sentkowska A., Biesaga M., Pyrżyńska K., „Effects of the operation parameters on HILIC separation of flavonoids on zwitterionic column”, Talanta 115, 2013, 284-290.
3. Poboży E., Sentkowska A., Piskór A., "Comparison of three modifications of fused-silica capillaries and untreated capillaries for protein profiling of maize extracts by capillary electrophoresis", Journal of Separation Science 37, 2014, 2388-2394.
4. Pyrżyńska K., Sentkowska A., Recent developments in the HPLC separation of phenolic food compounds, Critical Reviews in Analytical Chemistry 45, 2015, 41-51.
5. Sentkowska A., Biesaga M., Pyrżyńska K., Polyphenolic composition and antioxidative properties of Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.) extract affected by different brewing processes, International Journal of Food Properties 18, 2015, 2009-2014.
6. Sentkowska A., Biesaga M., Pyrżyńska K., „Chromatographic behavior of quercetin and its glycosides on HILIC stationary phases”, Current Analytical Chemistry, przyjęte do druku.

Autorstwa rozdziałów w monografiach

1. Sentkowska A., Biesaga M., Pyrżyńska K., rozdział 10 „Application of HILIC column for the determination of catechins”. Monografia “Green tea and health: Antioxidant properties, consumption and role in disease prevention” Nova Publishers, 2015, ISBN: 978-1-63482-904-5.
2. Sentkowska A., Pękal A., Dróżdż P., Biesaga M., Pyrżyńska K., rozdział 9 „Aromatized green teas-the content of flavonoids and metals”. Monografia “Green tea and health: Antioxidant properties, consumption and role in disease prevention” Nova Publishers, 2015, ISBN: 978-1-63482-904-5
3. Sentkowska A., Biesaga M., Pyrżyńska K. rozdział 9 „Some analytical problems in extraction of quercetin and its glycosides from food samples”. Monografia “Quercetin: Food Sources, Antioxidant Properties and Health Effects” Nova Publishers ISBN: 978-1-63483-595-4, przyjęte do druku
4. Sentkowska A., Biesaga M., Pyrżyńska K., „Zastosowanie chromatografii HILIC w analizie ziół”. Monografia „Flawonoidy i ich zastosowanie” (red. M. Kopacz), Oficyna Wydawnicza Politechniki Rzeszowskiej, Rzeszów 2014, str. 281-288.

5. Poboży E., Sentkowska A., Trojanowicz M., „Zastosowanie zmodyfikowanych powierzchniowo kapilar do profilowania białek metodą elektroforezy kapilarnej”. Monografia „Chromatografia w praktyce” (red. A. Voekel, W. Wasiak), Wydawnictwo Politechniki Poznańskiej, Poznań 2011. ISBN 978-83-7775-084-1, str. 105-115.
6. Sentkowska A., Pyrzyńska K., „Zastosowanie chromatografii oddziaływań hydrofilowych (HILIC) do identyfikacji wybranych flawonoidów”. Monografia „Nauka i przemysł – metody spektroskopowe w praktyce” (red. Z. Hubicki), Lublin 2012. ISBN 987-83-7784-086-3, str. 268-273.
7. Sentkowska A., Pyrzyńska K., Biesaga M., „Wykorzystanie kolumn HILIC w analizie flawonoidów”. Monografia „Flawonoidy i ich zastosowanie” (red. M. Kopacz), Oficyna Wydawnicza Politechniki Rzeszowskiej, Rzeszów 2012, str. 290-298.
8. Sentkowska A., Pyrzyńska K., Biesaga M., „Wpływ rozpuszczalnika próbki na retencję flawonoidów w chromatografii HILIC”. Monografia „Flawonoidy i ich zastosowanie” (red. M. Kopacz), Oficyna Wydawnicza Politechniki Rzeszowskiej, Rzeszów 2012, str. 273-279.
9. Ganeczko M., Sentkowska A., Pyrzyńska K., „Chromatografia oddziaływań hydrofilowych w analizie specyjacyjnej selenu”. Monografia „Nauka i przemysł - metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości” Tom I (red. Z. Hubicki), Lublin 2014, str. 342-345.
10. Ganeczko M., Sobolewska E., Sentkowska A., Biesaga M., Pyrzyńska K., „Wpływ związków selenu na właściwości antyutleniające związków polifenolowych”. Monografia „Nauka i przemysł - metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości „ Tom I (red. Z. Hubicki), Lublin 2014, str. 346-349.

Wykaz publikacji wystanych do czasopism

1. Sentkowska A., Biesaga M., Pyrzyńska K., „Analysis of flavonoids under different chromatographic modes” *Journal of Chromatographic Sciences*
2. Sentkowska A., Biesaga M., Pyrzyńska K., „Infusion and decoction of herbs: Antioxidant activity and characterization of phenolic compounds” *Food Science and Nutrition*
3. Sentkowska A., Jeszka-Skowron M., Pyrzyńska K., „Comparative studies on the antioxidant properties of different green coffee extracts” *Food Chemistry*
4. Jeszka-Skowron M., Sentkowska A., Pyrzyńska K., „Bioactive compounds and antioxidant properties of green coffee brews – influence of green coffee bean preparation” *Food Composition and Analysis*

Załącznik 2

Udział w konferencjach naukowych

1. Sentkowska A., Poboży E., Trojanowicz M., poster „Modifications of capillaries for protein profiling in analysis of plant extracts” 10th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, Zagrzeb, Chorwacja 7-14.07.2010.
2. Sentkowska A., Pyrzyńska K., Biesaga M., komunikat „Wykorzystanie kolumn HILIC w analizie flawonoidów”, IX konferencja „Flawonoidy i ich zastosowanie” Polańczyk Zdrój, 10-11.05.2012.
3. Sentkowska A., Pyrzyńska K., Biesaga M., plakat „Wpływ rozpuszczalnika próbki na retencję flawonoidów w chromatografii HILIC”, IX konferencja „Flawonoidy i ich zastosowanie” Polańczyk Zdrój, 10-11.05.2012.
4. Sentkowska A., Poboży E., Trojanowicz M., komunikat „Modifications of capillaries for protein profiling in analysis of plant extracts”, 12th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, Cluj Napoca, Rumunia, 8-13.07.2012.
5. Sentkowska A., Pyrzyńska K., Biesaga M., plakat „Zastosowanie chromatografii oddziaływań hydrofilowych (HILIC) do identyfikacji wybranych flawonoidów” V Ogólnopolskie Sympozjum „Nauka i przemysł – metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości”, Lublin 12-14.06.2012.
6. Sentkowska A., Pyrzyńska K., Biesaga M., plakat „HILIC chromatography for flavonoids separation”, 29th International Symposium on Chromatography, Toruń 9-13.09.2012.
7. Sentkowska A., Pyrzyńska K., Biesaga M., wykład „Chromatografia oddziaływań hydrofilowych w analizie flawonoidów ” VII Konferencja „Analityczne zastosowanie chromatografii cieczowej” Warszawa, 25-26.10.2012.
8. Sentkowska A., Góra M., Jasińska A., Biesaga M., Pyrzyńska K., Mieczkowski J., poster „Porównanie sorbentów do ekstrakcji flawonoidów ” VII Konferencja „Analityczne zastosowanie chromatografii cieczowej” Warszawa, 25-26.10.2012.
9. Sentkowska A., Biesaga M., Pyrzyńska K., poster „Analysis of some flavonoids in fruit juices using HILIC chromatography” Eurofoodchem XVII, Turcja, Istambuł, 07-10.05.2013.
10. Sentkowska A., Biesaga M., Pyrzyńska K., komunikat „HILIC chromatography in analysis of phenolic compounds in some herbal infusions” ICFSN 2013 : International Conference on Food Science and Nutrition, Wielka Brytania, Londyn, 08-09.07. 2013.
11. Sentkowska A., Biesaga M., Pyrzyńska K., poster „ Comparison of Sorbents for Extraction of Flavonoids” Euroanalysis XVII, Warszawa 25-29.08. 2013.

12. Sentkowska A., Biesaga M., Pyrżyńska K., plakat „HILIC chromatography in the analysis of flavonoids” Euroanalysis XVII, Warszawa 25-29.08.2013.
13. Sentkowska A., Biesaga M., , Pyrżyńska K., komunikat „Chromatografia oddziaływań hydrofilowych w analizie naparów ziół”, III Krajowa konferencja - Naturalne substancje roślinne – aspekty strukturalne i aplikacyjne. Puławy 4-6.09. 2013.
14. Sentkowska A., Biesaga M., Pyrżyńska K., komunikat „Chromatografia oddziaływań hydrofilowych w analizie związków polifenolowych” Konferencja „od MPD do KNOW” Rawa Mazowiecka 27-29.09. 2013- nagroda za najlepsze wystąpienie ustne.
15. Sentkowska A., Biesaga M., Pyrżyńska K., plakat „Hydrophilic interaction chromatography of polyphenolics compounds in the analysis of some herbs” 8th ISANH Congress on Polyphenols Applications, Portugalia, Lizbona 5-6.06.2014.
16. Sentkowska A., Biesaga M., Pyrżyńska K., komunikat „Application of hydrophilic interaction chromatography for the analysis of polyphenolic compounds in some drinks”14th International Symposium and Summer School on Bioanalysis Bratislava-Smolenice, Słowacja, 28.06-06.07.2014.
17. Sentkowska A., Biesaga M., Pyrżyńska K., plakat „HILIC chromatography-powerfull technique in the analysis of polyphenols ” 9th World Congress on Polyphenols Applications, Malta, St. Jullians, 3-5.06. 2015.
18. Sentkowska A., Biesaga M., Pyrżyńska K., komunikat „HILIC in the analysis of flavonoids-comparison of different stationary phases, 15th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, Rumunia, Turgu-Mures 13-18.07.2015.

Załącznik 3

Stáže zagraniczne

1. Uniwersytet Medycyny i Farmacji "IULIU HATIEGANU", Wydział Farmaceutyczny, Cluj-Napoca, Rumunia, 1-31 lipca 2012, grupa badawcza prof. R. Opreana.
2. Uniwersytet Wiedeński, Wydział Chemii Analitycznej, Wiedeń, Austria, 1-31.05.2014, grupa badawcza prof. M. Cichnej-Markl.
3. Uniwersytet Karola w Pradze, Wydział Nauk Ścisłych, Praga, Czechy, 1-31.05.2015, grupa badawcza prof. E. Tesarovej.